

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE LA STRUCTURE
DE LA PAROI ECTOPLASMIQUE
D'EBERTHELLA TYPHI

*Travail du Laboratoire de Bactériologie
de la Section Technique de Recherches et d'Etudes
des Services de Santé des Armées*

(Chef de Laboratoire : Médecin-Commandant L. COLOBERT)

THÈSE POUR LE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITÉ DE LYON (Section Pharmacie)

*présentée et soutenue publiquement devant la Faculté mixte
de Médecine et de Pharmacie de LYON, le 30 Juin 1960*

PAR

Olivier CREACH

PHARMACIEN
CERTIFIÉ DE CHIMIE GÉNÉRALE I

né le 27 Juillet 1932, à SANTEC (Finistère)

PARIS

IMPRIMERIE R. VANÇON
16, RUE DE LA GLACIÈRE (13°)

—
1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Contribution à l'étude de la structure
de la paroi ectoplasmique
d'*Eberthella Typhi*

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE LA STRUCTURE
DE LA PAROI ECTOPLASMIQUE
D'EBERTHELLA TYPHI

*Travail du Laboratoire de Bactériologie
de la Section Technique de Recherches et d'Études
des Services de Santé des Armées*

(Chef de Laboratoire : Médecin-Commandant L. COLOBERT)

THÈSE POUR LE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITÉ DE LYON (Section Pharmacie)

*présentée et soutenue publiquement devant la Faculté mixte
de Médecine et de Pharmacie de LYON, le 30 Juin 1960*

PAR

Olivier CREACH

PHARMACIEN

CERTIFIÉ DE CHIMIE GÉNÉRALE I

né le 27 Juillet 1932, à SANTEC (Finistère)

PARIS

IMPRIMERIE R. VANÇON
16, RUE DE LA GLACIÈRE (13°)

1960



La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation.

**FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON**

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen honoraire M. J. LEPINE
Correspondant de l'Institut M. H. HERMANN, Doyen.
Assesseur M. M. LEVRAT

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. NICOLAS, COLLET, GUIART, CADE, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND,
MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY

PROFESSEURS

Physiologie	MM. HERMANN
Clinique urologique	CIBERT
Physique biologique, radiologie, physiothérapie	PONTHUS (détaché à Beyrouth)
Clinique neuro-psychiatrique et hygiène mentale	DECHAUME
Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire	ROCHET
Clinique des maladies infectieuses et bactériologie	X.
Chimie organique et toxicologie	CHAMBON
Clinique chirurgicale	WERTHEIMER
Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale ..	DELORE
Clinique médicale	PAUPERT-RAVAULT
Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires	FROMENT
Clinique médicale	CROIZAT
Chimie biologique et médicale	ENSELME
Clinique chirurgicale	MALLET-GUY
Clinique de chirurgie orthopédique et de chirurgie infantile ..	GUILLEMINET
Pharmacie galénique et matière médicale	REVOL
Clinique gynécologique	POLLOSSON
Clinique obstétricale	PIGEAUD
Médecine du travail	BOURRET
Clinique médicale	LEVRAT
Hygiène et action sanitaire sociale	SOHIER
Clinique stomatologique	DUCLOS
Clinique médicale infantile et hygiène du 1 ^{er} âge	BERNHEIM
Biologie médicale et pharmacodynamie	JOURDAN
Botanique et cryptogamie	NETIEN
Clinique chirurgicale	BERTRAND
Chimie analytique pharmaceutique	BADINAND
Pharmacie et pharmacologie	DREVON
Médecine légale et déontologie	ROCHE
Parasitologie et pathologie exotique	COUDERT
Clinique oto-rhino-laryngologique	MOUNIER-KUHN
Clinique ophtalmologique	PAUFIQUE
Clinique dermatologique et syphiligraphique	THIERS
Clinique de pneumo-phthisiologie	BRUN
Clinique traumatologique des membres	CREYSSEL Jean
Cancérologie	D'ARGENT
Anatomie pathologique	GUICHARD
Pathologie générale et expérimentale	GIRARD Paul
Anatomie	LATARJET
Pathologie chirurgicale	PEYCELON
Thérapeutique	GIRARD Marcel
Pathologie médicale	VACHON
Physio-pathologie des voies respiratoires	GALY
Histologie	KEHL

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée à la médecine	MM. BERGER
Technologie pharmaceutique	DORCHE

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Obstétrique	MM. BANSSILLON
Parasitologie	ROMAN
Bactériologie	BERTOYE
Physiologie	CIER J.-François
Physiologie	CHATONNET

MAITRES DE CONFERENCES — AGREGES

Chimie organique et toxicologie	MM. PERROT Louis
Anatomie pathologique	FEROLDI Jacques
Pharmacie et pharmacologie	CIER André
Chimie biologique et médicale	CREYSSSEL Roger
Anatomie	DUROUX Emile
Thérapeutique	BRETTE René
Histologie	DUMONT L.-Prosper
Hygiène	THIVOLET Jean
Parasitologie	GARIN Jean-Paul
Physique	MORET Robert
Botanique et cryptogamie	ODDOUX Lucien

AGREGES EN EXERCICE**Chargés d'enseignement**

Neuro-chirurgie	MM. LECUIRE
Cardiologie	GONIN André
Obstétrique	MATHIEU Jacques
Orthopédie	MARION Joseph
Propédeutique médicale	PONT Maurice
Pathologie médicale	VIGNON Georges
Pathologie médicale	REVOL Louis
Pathologie chirurgicale	JAUBERT de BEAUJEU
Médecine générale	TRAEGER Jules
Pathologie chirurgicale	GUILLEMIN Georges
Electro-radiologie	PAPILLON Jean
Obstétrique	BURTHIAULT René
Pédiatrie, puériculture	FRANÇOIS René
Médecine générale	GUINET Paul
Pathologie chirurgicale	SAUTOT Jean
Chirurgie générale	MARION Pierre
Chirurgie générale	MICHAUD Pierre
Maladies infectieuses	MONNET Paul
O. R. L.	GIGNOUX Marcel
Stomatologie	FREIDEL Charles
Médecine générale	PLAUCHU Marcel
Pathologie médicale	DEVIC Michel
Médecine légale	COLIN Marcel
Neurologie	GUYOTAT Jean
Obstétrique	DUMONT Martial
Urologie	DURAND Louis-Noël
Chirurgie générale	FRANCILLON Jacques
Médecine générale	DESPIERRES Charles
Chirurgie générale	MOURGUES (de) G.
Chirurgie générale	SAUBIER Eugène
Dermatologie	COLOMB Daniel
Médecine du travail	TOLOT François
Neurologie, psychiatrie	SCHOTT Bernard
Ophthalmologie	BONAMOUR Georges

EXAMINATEURS DE LA THESE

MM. R. SOHIER, B. DEVON, A. CIER, J. THIVOLET

A MA FEMME

Elle a partagé mes soucis et mes joies.

Je lui dédie ce travail en témoignage de mon amour.

A MA FILLE

A MES PARENTS

*En témoignage de ma reconnaissance
et de mon affection.*

A MES BEAUX-PARENTS

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES AMIS

A la mémoire de mon camarade de Promotion

YVON PETITJEAN

A NOTRE MAITRE

MONSIEUR LE MÉDECIN-COMMANDANT L. COLOBERT

Breveté Technique

Maître de Recherches

Chef du Laboratoire de Bactériologie
de la Section Technique de Recherches et d'Etudes
des Services de Santé des Armées

Il a été l'instigateur de ce travail qu'il a conçu et dont il a suivi pas à pas la progression. Depuis notre arrivée dans son laboratoire, il n'a pas cessé de nous prodiguer ses conseils et son aide, ne ménageant ni son temps ni sa peine.

Pour la formation que nous lui devons et la sympathie qu'il nous a toujours manifestée, nous tenons à lui exprimer ici notre profonde reconnaissance et notre sincère attachement.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. SOHIER

Professeur d'Hygiène à la Faculté de Médecine de Lyon
Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Membre correspondant de l'Académie de Médecine
Expert de l'O.M.S.
Officier de la Légion d'Honneur

Il a bien voulu s'intéresser à ce travail au cours de son élaboration et il nous fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Nous le prions de bien vouloir trouver ici le témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY :

MONSIEUR LE PROFESSEUR B. DREVON

Professeur de Pharmacie et Pharmacologie

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce

Chevalier de la Légion d'Honneur

A la Faculté où il a été notre Maître, nous avons pu apprécier la richesse et la clarté de son enseignement. Il a toujours fait preuve d'une grande bienveillance à notre égard et nous lui sommes reconnaissant d'avoir bien voulu s'intéresser à notre travail et nous faire bénéficier de ses remarques et de ses conseils.

Nous voudrions lui présenter ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ A. CIER

Maître de Conférences — Agrégé de Pharmacie et Pharmacologie

En tant qu'officier des cadres de l'Ecole du Service de Santé Militaire, il a été tout d'abord pour nous un modèle. Nous avons ensuite bénéficié de son enseignement et de sa bienveillance à la Faculté, puis de son aide et de ses conseils à la Section Technique des Services de Santé des Armées.

Nous sommes heureux de le compter parmi nos juges et de lui exprimer notre respectueuse reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ J. THIVOLET

Maître de Conférences — Agrégé d'Hygiène

Nous le remercions d'avoir bien voulu accepter de juger cette thèse et nous lui exprimons notre respectueuse reconnaissance.

A NOS MAITRES DE LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON

A NOS MAITRES ET A NOS CHEFS
DU SERVICE DE SANTE MILITAIRE

AU PERSONNEL DU LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE
DE LA SECTION TECHNIQUE
DE RECHERCHES ET D'ETUDES DES SERVICES DE SANTE
DES ARMEES

P R E A M B U L E

Les bactéries, que l'on tend à grouper en un embranchement, celui des Schizomycètes, ont ceci de commun avec les végétaux, qu'elles présentent pour les isoler du macrocosme une enveloppe, une membrane, une coque, sécrétée certes par le protoplasme mais de nature non protoplasmique — c'est-à-dire non vivante — et que l'on qualifie pour cette raison de *paroi ectoplasmique*. PRÉVOT (285) la définit comme étant « cette enveloppe rigide qui assure : 1° le maintien de la forme spécifique; 2° le niveau de la tension interne qui, chez certaines bactéries, peut atteindre 20 atmosphères; 3° la perméabilité sélective ». Il souligne ainsi qu'elle possède à la fois une fonction mécanique de rigidité et de protection et une fonction physiologique, puisqu'elle doit être perméable aux éléments nutritifs, aux sécrétions et aux excréments. Mais sa nature ectoplasmique la distingue de la membrane cytoplasmique qui limite le protoplasme.

La paroi ectoplasmique présente un intérêt immunologique majeur, car elle constitue le support chimique d'une grande part des réactions spécifiques entre la bactérie et l'organisme hôte. C'est pourquoi l'identification des antigènes pariétaux, puis leur situation relative dans la paroi, retient tant l'attention des bactériologistes. Ceux-ci ont aussi reconnu que la paroi est un élément très organisé, véritable exosquelette de structure complexe, et ils ont été tentés, dans le premier effort d'analyse de structure, de la schématiser sous la forme de « couches antigéniques » se recouvrant les unes les autres. Ce concept « anatomique » n'était pas la seule interprétation possible et si les premiers immunologistes avaient été des chimistes, ils en auraient donné sans doute une représentation tout autre; aussi est-il surprenant de constater

que les efforts actuels de ces derniers — auxquels nous ajoutons notre modeste contribution personnelle — créent quelques raisons supplémentaires d'admettre ce schéma.

A notre arrivée, il y a trente mois, au Laboratoire de Bactériologie de la Section Technique de Recherches et d'Etudes des Services de Santé des Armées, le médecin-commandant COLOBERT — dans le cadre d'études se rapportant aux relations hôte bactérie — nous demanda d'entreprendre la purification et l'isolement du substrat du lysozyme contenu dans la paroi d'*Eberthella typhi*. Les travaux du laboratoire avaient en effet établi, sur des données morphologiques, enzymatiques et immunologiques, qu'il existait dans la paroi quelque élément de structure, fondamental mais directement inaccessible, hydrolysable par le lysozyme. L'obtention de ce constituant, la définition de sa situation dans la paroi, son identification biologique, constituaient une nouvelle étape intellectuellement très désirable; nous nous y sommes consacré. Notre travail se trouve ainsi présenté en deux parties, tout d'abord l'exposé de l'essentiel des connaissances actuelles sur la paroi des bactéries à Gram négatif, puis l'exposé de notre contribution personnelle. Dans les deux cas le plan est le même; après l'étude de la préparation de parois isolées, on aborde celle de l'identification chimique de leurs constituants, puis celle de l'organisation de ceux-ci.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE PREMIER

ISOLEMENT DES PAROIS

1. — TRAITEMENT DES BACTÉRIES PAR UN ALCALI

Les premières méthodes de préparation des parois bactériennes étaient basées sur le traitement des bactéries par un alcali. Dès 1887, VINCENZI (381) isole les parois ectoplasmiques de *Bacillus subtilis* à l'aide d'un traitement par la soude à 0,5 p. 100, suivi d'une digestion pepsique, qui les respecte. En réalité, il est difficile d'évaluer les altérations qui peuvent résulter d'un tel procédé. C'est pourquoi SALTON et HORNE (309) ont cherché à vérifier, dans le cas d'*Escherichia coli* et *Salmonella pullorum*, si les éléments qui ont résisté à la soude sont morphologiquement semblables aux parois obtenues par d'autres méthodes. A la suite d'une étude poursuivie au microscope électronique, ils concluent que ces éléments sont morphologiquement différents des parois obtenues par chauffage ou par broyage mécanique avec l'appareil de MICKLE (309, 310); d'autre part, celles de *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Salmonella pullorum* obtenues par cette dernière méthode, subissent des modifications chimiques si on les traite par une solution normale de soude à + 37°C pendant 48 heures (310).

Cependant, KANDLER et coll. (180, 181) ont repris cette méthode à la soude pour préparer des parois de bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Après une succession de traitements par la soude à + 60°C, les auteurs isolent finalement ce qu'ils appellent « la substance fondamentale de la paroi »; mais, manifestement, celle-

ci ne possède pas l'organisation caractéristique de la paroi ectoplasmique. Un tel procédé peut d'ailleurs détruire suffisamment cette organisation pour que se trouvent passer en solution certains polyosides constitutifs. Ainsi, SCHUTTE et KRISCH (334) utilisent une solution de soude pour dissoudre le polyoside de *Micrococcus lysodeikticus* constituant le substrat du lysozyme.

2. — RUPTURE DES BACTÉRIES PAR CHAUFFAGE

Confirmant les résultats obtenus par HEDEN et WICKOFF (145), SALTON et HORNE (308, 309) ont démontré que les parois des espèces à Gram négatif, au contraire de celles à Gram positif, sont rompues si on projette un petit volume de suspension bactérienne dans un grand volume d'eau porté à $+80-100^{\circ}\text{C}$. Ils font subir alternativement aux bactéries des traitements à $+55-100^{\circ}\text{C}$ et à 0°C , puis procèdent à une centrifugation différentielle pour éliminer les bactéries non détruites et les éléments insolubles provenant du cytoplasme. Ils ont préparé par cette méthode des parois cellulaires d'*Escherichia coli*, *Salmonella pullorum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas pyocyanea* et *Streptococcus faecalis*.

Cette méthode paraît d'un rendement faible. De plus, il est vraisemblable que le chauffage altère certains constituants de la paroi. COLOBERT et LOUISOT (63) ont en effet montré à l'aide du microscope électronique qu'un tel traitement provoque des modifications de surface. On sait d'autre part que le chauffage fait passer en solution des constituants antigéniques riches en lipides provenant de la paroi cellulaire (59). Néanmoins, la combinaison d'un chauffage modéré puis d'un traitement par des enzymes protéolytiques semble constituer une méthode de choix. Le cytoplasme coagulé et dénaturé par le traitement thermique se trouve, dans ces conditions, parfaitement dissous.

3. — RUPTURE DES BACTÉRIES PAR CONGÉLATIONS DÉCONGÉLATIONS SUCCESSIVES

Si on alterne des congélations à basse température suivies de brusques décongélations, les parois de nombreuses bactéries subissent une rupture progressive qui s'accompagne d'une diffusion des constituants cellulaires. C'est ce qu'ont réalisé AVERY et CULLEN (10) dans le cas du pneumocoque. KOEPESELL et JOHNSON (195) auraient également obtenu la rupture des parois de *Clostridium butylicum* en maintenant la pâte cellulaire à l'état congelé.

Ces méthodes, quand elles sont utilisables, ont l'avantage d'être simples et de ne pas soumettre les bactéries à des traitements physiques ou chimiques violents.

4. — BROYAGE MÉCANIQUE DES BACTÉRIES (*)

Broyage à l'aide d'abrasifs.

Le broyage des levures avec du sable de quartz avait déjà permis à BUCHNER en 1897 (42) de préparer la zymase, procédé repris par MAC FADYEN et ROWLAND (222) en 1901 pour détruire *Eberthella typhi*, par STEVENS et WEST (352) en 1922 pour *Streptococcus hæmolyticus*. Ceux-ci avaient utilisé du verre pilé au lieu de sable, méthode qui a permis également à WIGGERT et coll. (409) d'extraire les enzymes de diverses bactéries.

On peut broyer les bactéries en faisant passer leur suspension mélangée à du verre pilé entre un cône de verre extérieur statique et un cône intérieur tournant (379). Cette méthode présente l'inconvénient de laisser intact un très grand nombre de bactéries. Une variante a d'ailleurs été décrite depuis par DA CHEN et MANN (76). MAC ILWAIN (223) propose de remplacer la poudre de verre, difficile à préparer, par un oxyde d'aluminium de qualité commerciale. HOCHSTER et WATSON (156) ont broyé manuellement *Pseudomonas hydrophila* avec de l'alumine; GEST et GIBBS (121), CARLSON et coll. (46) ont utilisé de la pierre ponce pulvérisée. POTTER et ELVEHJEM (283), puis DOCKSTADER et HALVORSON (91) ont mis au point un homogénéiseur. Ces derniers ont déterminé la proportion d'*Escherichia coli* détruite en fonction des quantités de bactéries, d'eau et d'abrasif utilisées. HUGHES (161) a proposé un appareil dans lequel le mélange bactéries-abrasif est placé dans un cylindre creusé dans un bloc d'acier et refroidi. Un piston mû par une presse spéciale fait passer le mélange à travers un canal étroit.

Broyage sans abrasif.

MAC FADYEN et ROWLAND (222) ont décrit un moulin mécanique qui leur a servi à écraser *Eberthella typhi*. Les bactéries sont introduites dans un mortier en forme de cône pointu, entouré d'air liquide. Un pilon également conique, bien adapté et mû mécaniquement, écrase, en une heure et demie à deux heures, 0,5 g. à 1 g. de bactéries fraîches qui se présentent alors sous la forme

(*) La plupart des méthodes décrites par HUGO (162) pour l'isolement des enzymes bactériens peuvent servir également à l'obtention des parois ectoplasmiques.

d'une poudre sèche. BARNARD et HEWLETT (15) ont utilisé un moulin à billes.

Pour broyer *Streptococcus hæmolyticus*, CZARNETZKY (75) procède de la manière suivante : les bactéries lyophilisées sont congelées à l'air liquide. Lorsque les cellules sont devenues cassantes, on les broie à l'aide d'un pilon, ce qui en détruit 85 p. 100. MUDD et coll. (254) ont modifié ce procédé en le rendant semi-automatique. L'appareil est constitué par une chambre métallique circulaire en monel contenant deux boules d'acier. Cette chambre tourne à demi immergée dans du méthyl-cellosolve refroidi à -80°C à l'aide de glace carbonique.

BOOTH et GREEN (34) ont utilisé un moulin pour bactéries humides où la suspension passe entre un rouleau et une cuvette. A l'aide d'une pompe, on peut faire repasser la suspension dans l'appareil. Ce procédé est peu intéressant pour de petites quantités de bactéries.

MUYS (255) a décrit un moulin automatique pouvant être utilisé en l'absence d'oxygène, quelle que soit la quantité de suspension à broyer. Malheureusement, cet appareil en verre a l'inconvénient d'être fragile. Récemment LAMANNA et coll. (200) ont mis au point un appareil pratique; un mélange de bactéries et de perles de verre est placé dans un tube en polyvinyle (Tigon B). Ce tube, mis en mouvement rapide par deux poulies tournantes, devient le siège à la fois d'une force centrifuge et d'une compression transmise au mélange placé à l'intérieur par l'intermédiaire des parois flexibles.

Broyage par agitation avec des petites particules.

MELTZER (232) en 1892 semble avoir été le premier à décrire le broyage des bactéries par agitation vigoureuse avec du sable fin et des petites particules de verre ou de métal. MAC FADIEN et coll. (221) ont déchiqueté la levure en l'agitant fortement avec du sable, l'appareil étant refroidi pendant l'opération. Plus récemment, CURRAN et EVANS (74) qui cherchaient une technique de destruction des spores bactériennes en suspension, ont étudié l'influence de la nature de l'abrasif, de la taille des particules, de la densité des suspensions de spores et de la vitesse d'agitation sur la destruction. Ces techniques ont été perfectionnées par KING et ALEXANDER (190).

En 1948, MICKLE (238), appliquant un principe énoncé par VON ARDENNE (7), a mis au point un appareil d'agitation mécanique rapide des bactéries ou levures en contact avec des perles

de verre. Dans cet appareil, deux barres d'acier faisant ressort vibrent à la fréquence du courant électrique alternatif du secteur. L'une des extrémités de chaque barre est fixe; l'autre porte un récipient cylindrique en verre. Ainsi se trouve agitée et broyée la suspension de micro-organismes (30 à 50 mg de poids sec), mélangée à un tiers de son volume de perles de verre très petites (ballotini). Dans le cas d'*Escherichia coli*, cette méthode permet de détruire 80 % des bactéries en 20 minutes. De nombreux auteurs ont utilisé l'appareil de MICKLE pour préparer des parois bactériennes, en particulier DAWSON (86), ISHIMOTO (169), SALTON (314), CUMMINS et coll. (72,73). SALTON et HORNE (308, 309) ont présenté de très belles microphotographies électroniques de parois ainsi obtenues à partir de *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Salmonella pullorum*.

NOSSAL (265, 266) a décrit un agitateur à grande vitesse, dont la fréquence d'agitation peut dépasser 5.000 par minute. L'appareil est placé dans une chambre froide à + 2°C et, après 10 à 30 secondes de fonctionnement, la température du contenu ne dépasse pas + 15°C. D'après NOSSAL, cet appareil détruit les bactéries plus rapidement que celui de MICKLE. C'est pour cette raison que HAYASHI (144), l'a utilisé pour préparer des parois d'un streptocoque. Un appareil d'un autre type, mais fondé sur le même principe, a récemment été mis au point par la firme Braun de Melsungen (Allemagne).

5. — DESTRUCTION DES BACTÉRIES PAR LES ULTRASONS

Deux techniques principales peuvent être utilisées pour produire des ondes ultrasoniques. L'une est basée sur l'effet de magnétostriction que présentent certains métaux ferreux, particulièrement le nickel; l'autre sur l'effet piézo-électrique que présentent le quartz et, comme on l'a montré plus récemment, le titanate de baryum. Les fréquences obtenues par la première, ne dépassent pas 50 Kilocycles, tandis que la seconde permet d'obtenir 300 à 1.500 Kilocycles.

Les effets biologiques des vibrations ultrasoniques ont été étudiés par WOOD et LOOMIS (413) qui ont décrit la lyse des érythrocytes obtenue par ce procédé. HARVEY et LOOMIS (143) ont montré que les bactéries lumineuses pouvaient être broyées par des ondes ultrasoniques de 400 Kc. CHAMBERS et FLOSDORF (47) ont utilisé un oscillateur à magnétostriction de 8.900 cycles pour préparer le matériel antigénique labile d'*Eberthella typhi* et *Streptococcus haemolyticus*.

On ne connaît pas avec certitude le mécanisme de la destruction des bactéries par les ultrasons. LOISELEUR (211) explique le cisaillement des bactéries par « l'effet oxydant d'atomes d'oxygène activés par l'onde de choc ultrasonore ». ROUYER et GRABAR (303) pensent que le facteur principal de la lyse des bactéries est la *cavitation*, phénomène qui « prend naissance chaque fois que se produit dans un liquide contenant des gaz dissous des dépressions dépassant sa tension de vapeur ». La cavitation donne naissance à des ondes de choc à front raide dont la valeur peut atteindre plusieurs centaines d'atmosphères, ce qui expliquerait les effets mécaniques des ultrasons.

De nombreux arguments plaident en faveur de cette seconde hypothèse. Plusieurs auteurs (303, 172, 191, 129) ont, en effet, montré que la destruction des cellules par les ultrasons est réduite si on élimine tous les gaz dissous de la suspension. D'autre part, une augmentation de pression de la phase gazeuse, située au-dessus de la suspension irradiée, inhibe aussi la lyse (191, 303). Ces deux phénomènes semblent être en relation avec une absence ou une diminution de la cavitation.

Cependant, CHAMBERS et GAINES (48) font remarquer que la véritable cavitation est indépendante de la présence des gaz dissous et qu'elle apparaît même en l'absence de gaz, si la puissance est assez élevée. D'après ces mêmes auteurs, la cavitation ne s'observe pas dans la totalité du volume du liquide irradié. Elle serait limitée à des zones restreintes et, pour des suspensions dégazées, à la zone voisine de l'extrémité du conducteur.

Quoi qu'il en soit, des phénomènes chimiques d'oxydation se surajoutent toujours aux phénomènes mécaniques (286, 287, 288, 289). PRUDHOMME et GRABAR (286) ont montré qu'ils se produisaient même en l'absence d'oxygène dissous. Selon toute vraisemblance, ils sont dus à une scission des molécules d'eau et à la formation de radicaux libres par un processus analogue à celui que l'on observe dans le cas de la photolyse de l'eau; l'effet final serait donc une hydroxylation. Ce mécanisme permet d'interpréter l'action microbicide des ultrasons sur les bactéries en suspension dans l'eau.

L'usage des ultrasons en bactériologie a été étudié en détail par NAIMARK (256) et THORNLEY (369). Récemment DAVIES (85) a étudié d'une manière systématique les nombreux facteurs pouvant modifier la lyse des micro-organismes par les ultrasons. On retiendra l'importance de la géométrie des récipients contenant la suspension microbienne, l'importance du pH et de la nature des solutions

tampons utilisées. SEVAC et coll. (336) se sont servis de cette méthode pour étudier la structure de *Streptococcus pyogenes*, TISSIÈRES et coll. (371) pour isoler des granules d'*Azotobacter vinelandii*, ROTMAN (302), pour *Escherichia coli*; enfin BOSCO (35) l'a utilisée comme méthode générale de préparation des parois ectoplasmiques.

6. — DESTRUCTION DU PROTOPLASME PAR ACTION ENZYMATIQUE

La plupart des bactériologistes sont d'accord sur le fait que la trypsine n'attaque pas la cellule bactérienne vivante et que seules les bactéries à Gram négatif seraient digérées par cet enzyme, à condition qu'on les ait chauffées au préalable. Ainsi, KANTOROWICZ (182), étudiant la lyse des suspensions bactériennes par la trypsine, a constaté que les bactéries à Gram positif ou négatif chauffées à $+60^{\circ}\text{C}$ ne présentaient aucun signe de lyse; tandis que les bactéries à Gram négatif, après chauffage à $+75^{\circ}\text{C}$ et au-dessus, étaient intégralement digérées par la trypsine à la concentration de 1 %.

KRUSE (198) a cependant réfuté cette opinion en affirmant que la lyse qu'on a pu observer accidentellement, même sur des bactéries à Gram positif, ne serait pas due à la trypsine mais à des ferments autolytiques. En revanche, DUBOS (96) a montré que les pneumocoques détruits par la chaleur, bien que conservant la positivité de la réaction de Gram, perdaient encore, après digestion par la trypsine, 75 % de leur poids primitif.

SALTON et HORNE (308), à l'aide d'observations faites au microscope électronique, ont montré que le chauffage à $+75^{\circ}\text{C}$ - 100°C avait pour effet de provoquer une rupture de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif. Cette rupture varie d'ailleurs suivant l'espèce, ce qui expliquerait les observations de KANTOROWICZ : seules les bactéries dont la paroi ectoplasmique est rompue seraient attaquées par la trypsine, la rupture de la paroi ouvrant à l'enzyme l'accès aux protéines du cytoplasme. SALTON (315) pense, en effet, que la résistance à la trypsine des bactéries vivantes serait due à la protection qu'assure leur paroi cellulaire intacte. Ayant remarqué, cependant, qu'à l'encontre des autres bactéries à Gram positif, *Bacillus megaterium* était sensible à la trypsine après chauffage, cet auteur admet qu'à côté d'une rupture des parois, qui n'est pas évidente à l'examen microscopique direct, on peut concevoir d'autres altérations comme la fusion des constituants lipidiques. Il suffirait donc, pour obtenir une digestion, de rendre la paroi perméable aux ferments protéolytiques.

TOMCSIK et GUÉX-HOLZER (374, 376) ont pu constater d'autre part, que la trypsine, en l'absence de tout chauffage préalable, digère le cytoplasme de *Bacillus* « M » voisin de *Bacillus megaterium*, encapsulé ou non. TOMCSIK et GRACE (377) ont montré qu'il en est de même pour *Bacillus megaterium* et *Bacillus anthracis*. Ils ont pu établir que, dans le cas de *Bacillus* « M », c'était vraisemblablement la digestion d'une protéine thermolabile, située à la surface, qui ouvrait l'accès aux ferments protéolytiques. GORBACH et HOFFMAN (131), puis BERTRAB (22), ont observé une sensibilité analogue de *Bacillus subtilis* à la trypsine.

Ces derniers travaux se trouvant en contradiction avec l'opinion généralement admise, TOMCSIK et BAUMANN-GRACE (373) ont cherché à préciser si ces résultats divergents n'étaient pas dus à des traces d'un autre enzyme qui souillerait les préparations de trypsine, ou si la résistance de certaines bactéries à la trypsine était une propriété inhérente à l'espèce. Après avoir essayé sur différentes souches de *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, et *Bacillus anthracis* divers échantillons de trypsine, de ribonucléase et de papaïne, ils concluent qu'il faut reviser l'opinion généralement admise jusqu'ici, selon laquelle un chauffage préalable est nécessaire. Ils ont pu montrer, en effet, qu'au cours d'une digestion tryptique du cytoplasme de bactéries vivantes, on constate des différences soit individuelles, soit inhérentes à l'espèce. Ils pensent que l'action de la trypsine dépendrait de la perméabilité de la paroi bactérienne vis-à-vis de celle-ci.

De nombreux auteurs ont préparé les parois ectoplasmiques par digestion enzymatique des bactéries préalablement chauffées. MASON et POWELSON (228) ont utilisé cette technique pour isoler les parois de *Mixococcus xanthus*. Ils ont proposé également l'usage de la chymotrypsine, après un traitement préalable par l'éthanol à 70 %. Ceci fait penser que l'opération qui précède la digestion enzymatique a pour objet la dénaturation des protéines cellulaires. On sait en effet, que la trypsine et la chymotrypsine n'hydrolysent pas, en général, les protéines dans leur état natif. WEIDEL (391) a décrit d'une manière détaillée une méthode de préparation des parois d'*Escherichia coli* conservant leur activité réceptrice vis-à-vis des phages T₂, T₄ et T₆. Elle est fondée sur l'action de la trypsine faisant suite à une autolyse profonde des bactéries conservées sous toluène. Les parois ainsi obtenues constituent une fraction homogène à l'ultracentrifugation et à l'électrophorèse (391); on a pu cependant y déceler, au microscope électronique, la présence de quelques matériaux cytoplasmiques (320). Etant donnée l'importance des travaux de WEIDEL sur la composition chimique et

l'organisation des parois d'*Escherichia coli*, nous serons amené, dans l'exposé de notre travail expérimental, à discuter longuement la valeur de cette méthode de préparation. Il paraît en effet possible, que l'autolyse ait pour effet d'éliminer de la paroi un certain nombre de constituants chimiques, et notamment les glucides constitutifs de l'antigène somatique, dont WEIDEL ne trouve pas trace (391).

De nombreux auteurs ont enfin combiné des procédés de broyage mécanique et de digestion enzymatique. C'est ce qu'ont réalisé CUMMINS et HARRIS (72) qui ont finalement fait agir la trypsine, la ribonucléase et la pepsine pour purifier les parois. Cette méthode a été reprise par HAYASHI et BARKULIS (144) dans une étude de la paroi des streptocoques. Ils n'ont trouvé aucune différence dans la composition après traitement par la trypsine, la chymotrypsine ou des mélanges bruts d'enzymes pancréatiques. Dans tous ces traitements, l'effet global est une perte de 40 % du poids sec des membranes bactériennes, avec peu de modification d'aspect décelable au microscope électronique.

Les travaux de STRANGE et THORNE (356), SALTON et GHUYSEN (324), PARK et STROMINGER (273), SNELL et coll. (342) ayant montré que les isomères D de l'alanine et de l'acide glutamique sont présents en grande quantité dans les parois bactériennes, on a pu penser (419) qu'une structure contenant des acides D-aminés puisse résister à l'hydrolyse par des enzymes comme la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine ou même à l'hydrolyse combinée de ces enzymes trouvés dans les extraits pancréatiques bruts.

CHAPITRE II

LES CONSTITUANTS DE LA PAROI DES BACTERIES A GRAM NEGATIF

L'étude des substances chimiques responsables des propriétés antigéniques et biologiques des bactéries à Gram négatif, a amené rapidement les chimistes à isoler des constituants pourvus de ces propriétés et qui se trouvaient contenir à la fois des glucides, des lipides et des constituants protéiques. C'est en 1933 que, pour la première fois, BOIVIN et MESROBEANU (28), grâce à leur technique à l'acide trichloracétique, parvinrent à isoler des bactéries l'endotoxine complexe, fortement et régulièrement antigénique, extrêmement toxique, ayant toutes les propriétés d'un antigène O « complet ». Ils travaillaient alors sur *Salmonella typhimurium*, mais ne tardèrent pas à généraliser leurs observations sur beaucoup d'autres espèces à Gram négatif appartenant à des familles très différentes. Ces résultats furent bientôt vérifiés et étudiés de différents côtés par des auteurs utilisant soit la technique originelle à l'acide trichloracétique, soit d'autres techniques.

Chauffés en milieu faiblement acide, ces antigènes O complets se décomposent en donnant trois fractions :

1° Une fraction soluble dans l'eau et insoluble dans l'alcool et l'acétone; c'est un polyoside spécifique, non antigénique et non toxique.

2° Une fraction insoluble dans l'eau et soluble dans les solvants organiques, il s'agit de substances phospholipidiques.

3° Une fraction insoluble dans l'eau comme dans les solvants organiques, qui semble être de nature polypeptidique.

Toutes les méthodes ultérieures de préparation des antigènes de bactéries à Gram négatif ont confirmé que l'on rencontrait dans celles-ci des complexes glucido-lipido-protéiques. Cependant, le fait que certaines fractions de la paroi résistent aux diverses méthodes d'extraction de l'antigène O complet, montre que ces antigènes ne représentent qu'une partie de celle-ci. L'analyse des résidus insolubles a d'ailleurs permis d'établir qu'ils contenaient également des glucides, des lipides et des acides aminés. Nous envisagerons successivement chacun de ces groupes de composés.

LES CONSTITUANTS GLUCIDIQUES

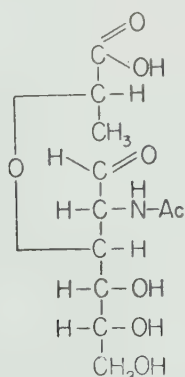
L'identification des oses obtenus après hydrolyse acide de l'antigène « complet » ou de sa fraction glucidique se fit, tout d'abord, par celle des osazones. Grâce à des techniques plus sélectives et d'usage plus simple, telles que la chromatographie sur papier, on a pu constater que les monoses que l'on y rencontre sont fort peu nombreux et pratiquement les mêmes dans les espèces bactériennes à Gram négatif appartenant aux différentes familles.

On trouve généralement un ou plusieurs des hexoses suivants : le d-glucose, le d-galactose, le d-mannose, et souvent en plus, des pentoses, en particulier le xylose et l'arabinose; enfin des méthylpentoses, notamment le l-rhamnose et le l-fucose (71). On soupçonne également l'existence — au moins dans certaines espèces — d'heptoses (80, 225) et d'acides uroniques (80). Récemment, on a montré l'existence, chez les salmonelles, de l'abéquose (281, 282, 397, 400, 403), du paratose (84, 112), du colitose (215), du tyvelose (281, 397, 400, 403), et de son antipode optique l'ascarilose (281, 282). Ce sont des didésoxyaldohexoses, très rapidement libérés des complexes antigéniques lorsqu'on hydrolyse par les acides minéraux dilués. Ils apparaissent bien avant les autres glucides réducteurs (après quelques minutes de chauffage); mais, par suite de leur instabilité en milieu acide, leur taux passe par un maximum puis décroît lentement au cours de l'hydrolyse (281, 282, 403, 404). On pense qu'ils se situent dans les liaisons terminales acido-labiles des polysaccharides à longue chaîne très hautement ramifiée. Il est remarquable qu'on n'ait pas rencontré jusqu'à présent de ribose et de désoxyribose (404) ni d'autres constituants des acides nucléiques (309).

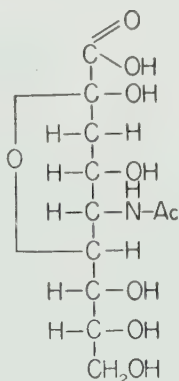
A côté de ces oses, l'hydrolyse acide permet d'isoler et de caractériser des osamines dont la présence paraît aussi générale dans les bactéries à Gram négatif que dans les bactéries à Gram positif, bien qu'elles s'y trouvent habituellement en concentration relative plus faible. D'après WORK (419), la glucosamine est toujours présente; la chondrosamine et la galactosamine paraissent moins répandues. Récemment, CRUMPTON et DAVIES (68) ont identifié la fucosamine dans la paroi de *Chromobacterium violaceum*.

De nombreux chercheurs avaient signalé la présence fréquente dans la paroi ectoplasmique des bactéries, aussi bien à Gram négatif qu'à Gram positif (323), d'un glucide aminé inconnu ayant les propriétés d'une hexosamine acide. STRANGE (354, 355, 358) l'a finalement caractérisé comme étant une 3-0- α -carboxyéthylhexosamine (*), à laquelle il a donné le nom d'« acide muramique » (**). Sa formule a pu être définitivement établie grâce à la synthèse de KENT (1957) (188, 358). D'après WORK (419), ce constituant serait présent dans toutes les parois bactériennes au même titre que la glucosamine.

Récemment, BARRY (16) a caractérisé, dans les parois de bactéries à Gram négatif, l'acide sialique, dont on connaît la parenté stéréochimique avec l'acide muramique, et qui est le constituant essentiel de nombreux mucopolysaccharides d'origine animale. HAYASHI et BARKULIS (144) ont montré que l'hydrolyse acide pouvait transformer rapidement une partie de l'acide muramique en glucosamine.



Acide muramique.



Acide sialique.

(*) D'après des travaux récents de ZILLIKEN (320), il s'agirait en réalité d'une 3-0-d-lactyl-d-glucosamine.

(**) Ce nom étant actuellement adopté par tous les auteurs, nous le conserverons dans la suite de notre exposé.

La présence de dérivés acétylés dans les parois bactériennes et dans les complexes antigéniques qu'elles contiennent, est difficile à établir, du fait de la fragilité de ces dérivés au cours de l'hydrolyse acide. Néanmoins, les résultats de SALTON (317), qui a caractérisé des acétyl-hexosamines dans les parois de bactéries à Gram positif lysées par le lysozyme, font penser que les oses aminés peuvent exister dans la paroi sous forme de dérivés acétylés.

Si les polysaccharides purifiés par hydrolyse ménagée (c'est-à-dire exempts de lipides) contiennent en général une certaine quantité d'hexosamine, ils peuvent également en être dépourvus; ainsi le polysaccharide spécifique purifié d'*Eberthella typhi* 0-901 ne contient pas d'azote (404).

Il est remarquable que cette analyse des constituants glucidiques des polyosides bactériens ait permis d'établir une différence entre les formes R et S des bactéries. Par l'analyse des lipopolyosides provenant de certaines souches et de leurs mutants génétiques, on a constaté que les désoxyglucides existant dans les formes S manquent totalement dans les lipopolyosides de leurs mutants respectifs (401, 403, 404). Dans le même ordre d'idées, BRAUN (39) a noté que les souches d'*Escherichia coli* pathogènes pour l'homme, contiennent fréquemment dans leur endotoxine des désoxyglucides, qu'on ne rencontre jamais dans les variétés non pathogènes (83).

Structure des polyosides spécifiques des antigènes.

La fraction polyosidique des endotoxines isolées des parois des bactéries à Gram négatif est responsable de la spécificité antigénique de ces bactéries. Or, la connaissance précise de leurs produits d'hydrolyse ne suffit pas à rendre compte de la spécificité sérologique des endotoxines. Cette dernière est liée à des détails d'architecture moléculaire, dans le secret desquels des travaux récents ont permis de pénétrer.

Ce sont des méthodes immunochimiques qui ont apporté des éclaircissements sur la structure de ces polyosides, en révélant la place et la nature des liaisons des différents monoses qui constituent les groupements antigéniques. Elles sont fondées sur le fait que les glucides terminaux des molécules complexes et ramifiées des polyosides sont beaucoup plus antigéniques que les monoses situés plus profondément dans la molécule. La capacité réactionnelle des divers animaux d'espèces différentes ou de même espèce paraît d'ailleurs variable. On peut trouver des sérums qui réagissent fort mal ou pas du tout pour des monoses intramoléculaires, alors que d'autres sérums donnent des réactions plus positives (176, 178, 351).

Cette particularité, ainsi que la possibilité d'utiliser des antisérums correspondant à des complexes polysidiques antigéniques de spécificité différente, ont conduit aux méthodes d'« inhibition spécifique » et de « précipitation croisée ».

La première, introduite par LANDSTEINER en 1945 (202), a pour principe l'inhibition compétitive de la réaction d'un antigène avec un anticorps spécifique, par un composé de plus faible poids moléculaire ayant une structure semblable à celle du groupement déterminant de l'antigène et donc capable de s'adapter au site antigénique de l'anticorps. Plus la similitude avec l'antigène est grande, plus le degré d'inhibition est important (178). Ainsi le glucose inhibe fortement la combinaison d'un antigène avec son anticorps spécifique si le glucide terminal de cet antigène est le glucose.

Comme l'a noté Mlle STAUB (351) :

« La multiplicité des anticorps correspondant à un même antigène ne fait plus de doute depuis les travaux de LANDSTEINER, HEIDELBERGER et HAUROWITZ (202). Les études physico-chimiques réalisées depuis sur les antigènes artificiels par TALMAGE et ses collaborateurs (367), KARUSH et EISEN (184), PRESSMAN et ses collaborateurs (264) ont confirmé et complété les conclusions des premiers auteurs.

« Cette multiplicité est due, en partie, à la présence de plusieurs groupements déterminants distincts sur l'antigène correspondant, et, en partie, à la présence de plusieurs anticorps correspondant à un groupement unique. Elle explique le mécanisme des réactions croisées ; tout antigène qui possède un groupement déterminant — totalement ou partiellement semblable à l'un de ceux de l'antigène homologue — sera susceptible de s'unir avec la totalité ou une partie des anticorps auxquels le même groupement de l'antigène homologue a donné naissance.

« Les réactions croisées entre les polyosides naturels d'origine animale, végétale ou microbienne ont pu être ainsi expliquées par la reconnaissance de groupements déterminants communs, totalement ou partiellement identiques (cf. 130, 147, 148, 149, 218, 219). »

L'utilisation des techniques d'inhibition spécifique et de précipitation croisée a permis à Mlle STAUB (349, 350, 351) d'apporter les premières notions sur la structure chimique des antigènes spécifiques des *Salmonella* et d'établir la nature des monoses terminaux partiellement responsables de la spécificité des antigènes 1, 2, 4, 8, 9, 12 et 35 du schéma de KAUFFMANN-WHITE. Elle a montré que, parmi ces glucides, les 3-6 didésoxyhexoses jouent un rôle prépondérant.

Coloration cytologique des polyosides bactériens.

On a décrit récemment deux méthodes pour la mise en évidence spécifique des polyosides dans les bactéries et spécialement dans leur capsule. La première, préconisée par HOTCHKISS (158), utilise le réactif de Schiff après traitement par le periodate des

préparations séchées et fixées par la chaleur. Malheureusement, tous les polyosides ne se colorent pas par cette méthode (100) qui peut, en revanche, colorer certains éléments du protoplasme et faire apparaître très souvent des granulations polaires. Dans le cas de bactéries à Gram négatif, celles-ci ont été, dès lors, attribuées au constituant polyosidique de l'antigène O (410). RONDANELLI et coll. (301) auraient même caractérisé dans ces corpuscules, des phospholipides et des protéines, en plus des polyosides. Cependant, la ressemblance des images ainsi obtenues, avec celles mettant en évidence l'appareil nucléaire des bactéries, est telle, qu'il se pourrait que ce soit le ribose ou le désoxyribose des nucléoprotéines, oxydés par le periodate, qui soient finalement responsables de cette coloration polaire.

La seconde méthode de coloration est celle décrite par NOVELLI (267), qui utilise le Bleu alcyan. Les capsules se colorent en bleu, et on obtient un contraste en colorant le corps bacillaire avec de la fuchsine basique. Il faut noter cependant que le Bleu alcyan colore, en plus des polyosides, beaucoup de monoses et d'acides organiques, ainsi que l'a montré MAC KINNEY (224).

Propriétés biologiques des polyosides.

Les réactions d'inhibition spécifique et de précipitation croisée, montrent que la spécificité antigénique dépend essentiellement de la fraction polyosidique des antigènes.

« Si on injecte des polysaccharides purifiés à un animal par voie sous-cutanée ou intraveineuse, il ne se développe pas d'anticorps dans le sérum (il n'en serait pas de même par d'autres voies). Mais, si on les met en présence d'un antisérum préparé par injection de la bactérie totale, on constate une combinaison avec précipitation. Ils répondent donc à la définition des haptènes. On a cherché par divers procédés à rendre le caractère d'antigène complet, vrai, à ces polyosides. Dans ce but, on a pu les adsorber sur un colloïde inerte (mastic par exemple) ou les copuler avec une protéine (en formant une glyco-azo-protéine). Dans les deux cas on a constaté l'apparition du pouvoir antigène et que le polyoside était seul responsable de la spécificité et non la protéine » (279).

Il a fallu très longtemps pour que l'on découvre que des polyosides purs pouvaient être antigéniques chez l'homme. Les premiers, HEIDELBERGER et collaborateurs (146) ont pu montrer que l'injection à l'homme de polyosides de pneumocoques, exempts de protéines, provoquait la formation d'anticorps très actifs et spécifiques. Ils ont ainsi utilisé ces polyosides pour vacciner (avec succès) les jeunes recrues américaines pendant la guerre. D'autre part, certains accidents survenus lors de l'utilisation de Dextrans comme succédané du plasma, ont attiré l'attention sur le fait que

ces Dextrans, bien qu'étant des polyosides purs, sont antigéniques chez l'homme (175, 229).

BOIVIN et DELAUNAY (31) ont constaté que les polyosides spécifiques obtenus à partir des bactéries à Gram négatif, ne sont pas non plus de purs haptènes. En utilisant un polyoside pur isolé du complexe antigénique de *Salmonella typhimurium*, ils ont pu mettre en évidence un pouvoir antigénique dont l'intensité varie selon l'espèce animale utilisée et selon le mode d'administration.

« Ainsi, entre les polysaccharides libres et les complexes divers où figurent ces polysaccharides comme éléments déterminants de la spécificité, il n'y a vraiment que des différences quantitatives dans le pouvoir antigénique » (31).

Lorsqu'ils sont à l'état pur, les polyosides spécifiques des bactéries sont dépourvus de toxicité. Ils possèdent, cependant, une propriété biologique importante découverte par DELAUNAY (31) ; ce sont des agents très actifs pour provoquer l'appel des leucocytes polynucléaires dans les foyers d'infection bactérienne.

Récemment, MEIER (230) a consacré une étude importante aux effets pharmacologiques des polyosides. Il a montré que, parmi ceux-ci, ceux qui provenaient des bactéries à Gram négatif étaient beaucoup plus actifs que les autres. Malheureusement, ces expériences ont été faites en réalité avec des lipopolyosides dont les propriétés biologiques, ainsi que l'a fait remarquer WESTPHAL (402), sont très distinctes de celles des polyosides.

LES CONSTITUANTS PROTÉIQUES

Les constituants de nature protéique contenus dans les antigènes O préparés selon la méthode de BOIVIN ne représentent qu'un pourcentage extrêmement faible, à tel point qu'ils avaient passé primitivement inaperçus et que BOIVIN désignait la substance sous le terme de complexe glucido-lipidique. Mais, l'usage d'autres techniques pour préparer les antigènes somatiques a montré que la fraction protéique pouvait représenter un pourcentage beaucoup plus élevé. Cette fraction donnant à l'hydrolyse des acides aminés paraît de nature polypeptidique.

Nature des acides aminés.

La chromatographie sur papier a servi à identifier les acides aminés obtenus par hydrolyse acide de la paroi ectoplasmique. Alors que les parois des bactéries à Gram positif n'en contiennent

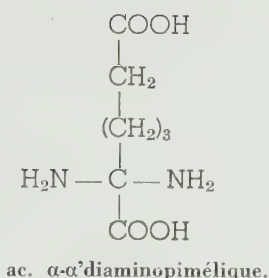
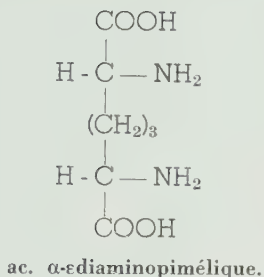
qu'une série limitée (l'absence d'acides aminés aromatiques, d'acides aminés soufrés, de proline, d'histidine et d'arginine est une caractéristique remarquable), les parois des bactéries à Gram négatif peuvent contenir tous ceux que l'on trouve dans la plupart des protéines communes. Aussi, SALTON (320) pense qu'il convient d'utiliser le terme de protéines plutôt que celui de polypeptides dans le cas des bactéries à Gram négatif. On doit noter, cependant, que la variété des acides aminés rencontrés dans les parois est relativement faible (trois ou quatre en général). Ceci différencie les endotoxines des mucoïdes et mucopolysaccharides qui en contiennent souvent une grande variété, comme, par exemple, ceux qui constituent les antigènes du groupe sanguin; celui du groupe A en contiendrait onze (3).

Les quatre acides aminés habituellement rencontrés sont : l'acide glutamique, l'alanine, l'acide diaminopimélique et la lysine; on trouve plus rarement l'acide aspartique, le glycolle ou la sérine. Les autres acides aminés, lorsqu'on les rencontre, ne sont présents qu'en très petite quantité. Des espèces appartenant à un même genre bactérien possèdent la même gamme d'acides aminés dans leur paroi. « L'acide diaminopimélique, qui constitue un caractère bactérien exclusif et dont les modes de son métabolisme sont spécifiques, génétiques et familiaux » (285), est toujours présent dans les bactéries à Gram négatif, alors que dans les bactéries à Gram positif on trouve, ou bien l'acide diaminopimélique, ou bien la lysine. D'après ANDERSON (5), les Eubactériales à Gram positif sont plus riches en lysine que les bactéries à Gram négatif, et ces dernières plus riches que les Actinomycétales.

Il est remarquable de constater que certains acides aminés peuvent exister dans la paroi sous la forme D, et souvent en grande proportion, en particulier dans le cas de l'acide glutamique et de l'alanine (jusqu'à 50 % pour le premier et 92 % pour le second). Ceci aurait, notamment, pour conséquence de rendre les parois résistantes aux enzymes protéolytiques (419). On ignore encore si les isomères D sont répartis uniformément avec les isomères L à l'intérieur des chaînes peptidiques, ou s'ils sont confinés dans certaines régions de la molécule (419).

Les acides diaminopiméliques.

La présence d'acides diaminopiméliques dans la paroi bactérienne constitue un caractère de grande importance biologique dont l'étude particulière vaut d'être entreprise.



Bien que sa synthèse remonte à 1908 (344), c'est en 1950 seulement que l'acide α - ϵ diaminopimélique fut isolé pour la première fois par WORK à partir de la paroi de *Corynebacterium diphtheriae* (414, 415, 416, 417). Ayant étudié sa répartition chez 118 espèces de bactéries, WORK et DEWEY (418) l'ont trouvé chez presque toutes, sauf chez les cocci à Gram positif, certains *Streptomyces* et *Actinomyces*, c'est-à-dire, comme le remarque PREVOT (285), chez des bactéries qui sont aux deux extrémités opposées de la classification bactérienne. IKAWA et O'BARR en 1955 (166) ont caractérisé chez *Lactobacillus arabinosus* l'acide α - α' diaminopimélique, optiquement inactif, combiné avec des protéines, et représentant 1 % du poids sec des cellules.

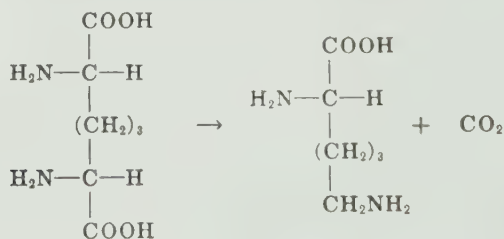
Comme on pouvait s'y attendre, l'acide α - ϵ diaminopimélique se rencontre sous les isomères D-L (mésos), LL et DD-*Escherichia coli*, par exemple, semble contenir un mélange de formes LL et DL (155); cette dernière paraissant la plus généralement répandue. Il est certain que ces acides diaminopiméliques sont des constituants de la paroi (72), mais on ignore s'ils s'y trouvent exclusivement ou s'ils entrent également dans la composition du protoplasme (320). WORK et DEWEY (418) ont suggéré que les acides diaminopiméliques pouvaient être responsables de la rigidité de la paroi bactérienne, du fait que leur structure leur permet de former des ponts intermoléculaires, par exemple avec des chaînes de polypeptides. Cette notion ne paraît cependant pas indispensable, puisqu'on n'a pas constaté de grosses différences de propriétés entre les parois des espèces qui contiennent de l'acide diaminopimélique et celles des espèces qui n'en contiennent pas.

Il semble maintenant prouvé qu'un des effets de la pénicilline sur les bactéries à Gram négatif serait d'empêcher l'incorporation de l'acide diaminopimélique dans la paroi, et, par voie de conséquence, de rendre impossible la constitution d'une paroi ectoplasmique rigide. C'est par ce mécanisme que l'on a pu interpréter l'apparition de formations L à partir de bactéries normales. Ainsi.

KANDLER (179, 180), a montré que si des quantités appréciables d'acide diaminopimélique peuvent être caractérisées chez la forme bactérienne normale de *Proteus vulgaris* et chez les formations L capables de réversion, cet acide disparaît, par contre, des formations L stabilisées (*). L'importance de l'acide diaminopimélique pour que se constitue la paroi bactérienne, a également été mise en évidence par MAC QUILLEN (226). Cet auteur a montré qu'un mutant d'*Escherichia coli*, incapable de synthétiser l'acide diaminopimélique, et pour lequel ce dernier constitue un facteur de croissance indispensable, peut cependant se développer dans un milieu de tonicité convenable, si l'acide diaminopimélique est remplacé par la lysine; mais, les bactéries prennent alors la même forme sphérique qu'après un traitement par la pénicilline, forme qui rappelle celle des protoplastes obtenus par dissolution spécifique par le lysozyme des parois de bactéries sensibles.

On a pu, d'autre part, soulever l'hypothèse (71) que la virulence des bacilles tuberculeux est, au moins pour une part, liée à la présence de l'acide α - ϵ diaminopimélique dans les lipopolyosides de la paroi (9). Cependant, l'acide diaminopimélique est décelable, non plus dans les fractions lipopolyosidiques, mais dans les cellules entières des bacilles tuberculeux non virulents (120).

L'acide diaminopimélique intervient enfin dans la synthèse de la lysine, à laquelle il conduit par décarboxylation :



Cette réaction est catalysée par un enzyme spécifique, la décarboxylase de l'acide diaminopimélique, différent pour chaque isomère. Les mutants d'*Escherichia coli* exigeant la présence de lysine pour leur développement, qui accumulent de grandes quantités d'acide diaminopimélique dans le milieu de culture, sont justement déficients en décarboxylase (89). La décarboxylase de l'acide α - ϵ diaminopimélique, chez *Aerobacter aerogenes*, paraît

(*) Cependant, WEIBULL (389 bis) a trouvé des petites quantités d'acide α - ϵ diaminopimélique également dans les formations L stabilisées.

spécifique de la forme méso et n'attaque pas les isomères DD et LL (153). Cependant, toutes les espèces bactériennes étudiées possèdent, en plus de la décarboxylase de l'acide diaminopimélique, une racémase diaminopimélique (à l'exception de *Sarcina lutea* qui n'a pas cette dernière), qui transforme les formes LL ou DD en forme méso. On aboutirait ainsi à la cadavérine suivant un mécanisme à trois temps :

1° Interconversion LL - ADP $\rightarrow$ méso ADP

2° Décarboxylation méso ADP $\rightarrow$ L-lysine

3° Deuxième décarboxylation L-lysine $\rightarrow$ cadavérine.

Ainsi, ce n'est pas toujours le même acide diaminopimélique que l'on trouve chez les bactéries, mais ses isomères, tantôt seuls, tantôt associés; le passage d'une forme à l'autre étant assuré par une racémase, permettant à une décarboxylase de transformer l'isomère convenable en lysine.

Le chaînon glycopeptidique pariétal homologue.

Il est frappant que malgré des différences de détail, on puisse isoler — tout spécialement des bactéries à Gram positif, mais également des bactéries à Gram négatif — un chaînon peptidique commun. Dans le premier cas, il serait constitué d'alanine, d'acide glutamique et, soit d'acide diaminopimélique, soit de lysine, avec parfois du glycocolle, de l'acide aspartique ou de la sérine et un constituant hexosaminique contenant de la glucosamine, de l'acide muramique et parfois aussi de la galactosamine (419). Dans le deuxième cas, il contiendrait de l'acide diaminopimélique, de l'acide glutamique, de l'alanine et, également, de la glucosamine et de l'acide muramique (419). C'est cet élément fondamental de la structure pariétale, présent dans les parois de toutes les bactéries, que WORK (419) a désigné sous les termes, d'ailleurs très équivoques, de « basal wall unit » ou « basal wall structure ».

C'est à ce niveau que se manifesterait l'action enzymatique de la trypsine qui altère profondément les parois des bactéries à Gram positif et, d'une manière beaucoup moins prononcée, les parois des bactéries à Gram négatif. C'est ce peptide qui se trouverait passer en solution lors de l'action du lysozyme ou d'hydrolases voisines, lors de la sporulation des *Bacillaceae* et, également, de la lyse phagique (419).

Détermination des acides aminés N-terminaux.

Il est difficile d'établir quels sont les acides aminés N terminaux dans la paroi ectoplasmique, étant donnée l'insolubilité de

celle-ci. Etudiant la réaction des parois bactériennes soumises à une digestion trypsique préalable, avec le 1 fluoro 2-4 dinitro-benzène, INGRAM et SALTON (168) ont trouvé que l'alanine et le glycocolle constituent les acides aminés N terminaux communs aux parois ectoplasmiques d'un certain nombre d'espèces à Gram négatif. Dans certaines parois, ce seraient aussi les acides aspartique et glutamique.

Cependant, dans l'état actuel des connaissances, on ne saurait dire avec certitude si les protéines possédant ces différents groupes N terminaux, constituent une partie essentielle du squelette de la paroi, si elles représentent des protéines de différents antigènes de surface ou, au contraire, des composés intracellulaires adhérant à la paroi.

La coloration de Gram.

GRAM (132) décrivit, en 1884, la méthode de coloration qui, depuis, a servi de base à la classification des bactéries. Cette méthode est fondée sur le fait que certaines bactéries ne sont plus décolorables par l'alcool, si, après le traitement par le violet de gentiane, elles subissent un mordantage par une solution iodo-iodurée (caractère Gram positif). Bien que n'ayant au départ qu'une base empirique, elle s'est révélée d'une grande importance dans la taxonomie bactérienne; de nombreux auteurs ont cherché depuis à relier le caractère Gram positif à un support chimique ou physicochimique.

Dans une étude importante, BARTHOLOMEW et MITTWER (18) ont rapproché le comportement vis-à-vis de la coloration de Gram d'autres propriétés des bactéries. Ainsi, les bactéries à Gram positif sont, en général, moins sensibles à l'action des enzymes protéolytiques, aux alcalis, aux azides, aux tellurites, aux agents oxydants et à la lyse par le complément en présence d'anticorps. En revanche, elles sont plus sensibles aux acides, aux détergents, aux solvants organiques et à l'iode. D'autre part, leur point isoélectrique est plus bas que celui des bactéries à Gram négatif. On peut noter également une différence de comportement vis-à-vis des antibiotiques.

Plusieurs auteurs ont relié le caractère Gram positif à la perméabilité de la paroi cellulaire (20, 41, 103), en particulier, vis-à-vis de l'alcool et de l'iode en solution alcoolique (183, 244). Il paraît probable que la perméabilité joue un rôle important dans la coloration de Gram, puisque les bactéries à Gram positif perdent ce caractère lorsque la paroi est rompue (20).

D'autres auteurs ont cherché à identifier des constituants propres aux bactéries à Gram positif. Si les traitements physiques ou chimiques susceptibles de détruire le caractère Gram positif sont nombreux, en revanche, il est souvent difficile de préciser les modifications qu'ils ont provoquées. L'extraction des lipides (94) ou le traitement par le lysozyme (387) font perdre à certaines bactéries leur caractère Gram positif. Il semble, cependant, que le rôle des lipides et des polyosides soit moins important que celui des acides ribonucléiques de la bactérie. DEUSSEN (88), le premier en 1918, a montré que le caractère Gram positif disparaissait après extraction des acides nucléiques et réapparaissait lorsqu'on restituait ces acides à la paroi. HENRY et STACEY (150, 151) ont pu observer le même phénomène avec un ribonucléate de magnésium extrait des bactéries à Gram positif. Ils ont émis l'hypothèse que le matériel Gram positif serait un complexe de haut poids moléculaire constitué d'une protéine basique, propre aux bactéries à Gram positif, et de ribonucléate de magnésium. Leurs observations ont été confirmées par BARTHOLOMEW et UMBREIT (17) qui ont observé une disparition du caractère Gram positif après un traitement par la ribonucléase. Depuis, MITCHELL et MOYLE (242) ont isolé de cette fraction ribonucléique un ester phosphorique présent à la fois dans la paroi cellulaire et dans la couche lipidique sous-jacente, et qui serait responsable du caractère Gram. Mais, STACEY et coll. (174) ont récemment retrouvé la même substance dans une bactérie à Gram négatif. L'hypothèse de HENRY et STACEY (150, 151) reste donc la plus valable, quoiqu'il semble aujourd'hui prouvé qu'au moins certaines bactéries à Gram positif ne possèdent pas d'acides nucléiques dans leur paroi (*).

LES CONSTITUANTS LIPIDIQUES

Les lipides constituent une classe de substances biologiques définies uniquement par leurs propriétés de solubilité dans certains solvants organiques; leur isolement est lui-même fondé sur la possibilité de les extraire spécifiquement par quelques autres solvants organiques.

Si on utilise l'éther, on constate que la quantité de lipides extractible à partir des parois des bactéries à Gram positif est négligeable (310, 314), alors qu'elle peut atteindre 8 % dans le

(*) La découverte récente (10 bis), dans la paroi de bactéries à Gram positif, de l'acide teichoïque (polymère d'un ribitol-5'-phosphate) apportera, peut-être, l'explication définitive de la coloration de Gram.

cas des bactéries à Gram négatif. Après hydrolyse des parois dans l'acide chlorhydrique 6 N pendant deux heures à $+100^{\circ}\text{C}$, ce pourcentage s'élève jusqu'à 22 % (314). Dans le cas des parois d'*Escherichia coli* par exemple, SALTON a obtenu respectivement 8,2 %, 8,6 % et 22 % de lipides, suivant qu'il opérait avec de l'éther, du méthanol à 95 % sous reflux, ou de l'éther après hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6 N (314).

« La haute teneur en lipides des parois des bactéries à Gram négatif conduit à penser que ceux-ci se comportent comme un ciment pour la mosaïque des molécules protéiques » (SALTON) (320).

WESTPHAL et coll. (397, 403) ont repris l'étude de la fraction lipidique des complexes glucido-lipido-protéiques qui constituent les antigènes O des bactéries à Gram négatif. Ils ont montré que le composé polyosidique appelé « polysaccharide non dégradé » par MORGAN et PARTRIDGE (248) contient en réalité 25 à 40 % de phospholipides, ce qui en fait un lipopolyoside. Cette fraction lipidique est constituée de deux lipides différents : l'un fortement lié, qu'ils désignent sous le nom de lipide A, l'autre, dont la liaison est moins solide, et qu'ils appellent lipide B. Nous étudierons successivement ces deux fractions.

Le lipide B.

Il a été isolé en 1940 par MORGAN et PARTRIDGE (248) à partir du complexe antigénique de *Shigella dysenteriae* et constitue la fraction de l'antigène soluble dans l'éther et le benzène. Les teneurs en azote et phosphore sont respectivement de 1,8 % et 3,9 %; le rapport N/P est donc égal à 1. Cette caractéristique, jointe à ses propriétés de solubilité, permet de le classer parmi les lipides du type céphaline. L'analyse qualitative a montré qu'il contenait de l'acide glycérophosphorique et, comme seuls acides organiques, les acides palmitique et oléique (248, 403, 404). Le constituant azoté n'a pas encore été identifié (403). GOEBEL et coll. (24) ont, par ailleurs, préparé le lipide B à partir de l'antigène complet de *Shigella flexneri*; celui-ci possède les mêmes caractères. CMELIK (50 à 53) a étudié en détail des lipides analogues extraits de diverses bactéries à Gram négatif.

(*) MORGAN oppose « degraded polysaccharide » et « undegraded polysaccharide ». « The undegraded polysaccharide differs from the degraded form, which results from the use of mild acid, in certain of its properties ; it is viscous and will recombine with the conjugated protein component to give an antigenic complex » (81). Les expressions « polysaccharide dégradé » et « polysaccharide non dégradé » sont assez équivoques en français.

Une des propriétés qui différencient le lipide B du lipide A est la fragilité de sa liaison avec le reste du complexe antigénique. Il s'en détache complètement sous l'action de la formamide additionnée de traces d'acide formique (249), ou sous l'action du phénol dilué (249). Il est probable que le traitement des bactéries à Gram négatif par des méthodes peu drastiques telles que le chauffage modéré, l'utilisation d'EDTA (*) ou de détergents comme le Teepol (**), libère tout ou une partie du phospholipide B (59). Celui-ci, contrairement au lipide A, n'est pas toxique et, jusqu'à présent, on ne lui connaît aucune activité biologique (403).

Le lipide A.

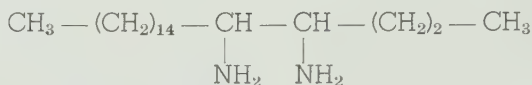
L'analyse a permis d'établir que les lipopolyosides purifiés — ou polysaccharides non dégradés — correspondant à diverses endotoxines bactériennes, présentent une grande similitude dans leur structure (403). Si on les traite par un acide minéral N pendant 30 minutes à chaud, on obtient une fraction appelée lipide A, insoluble dans l'eau, difficilement soluble dans l'éther et le benzène, mais facile à dissoudre dans le chloroforme et la pyridine. De telles substances ont été isolées par MILES et PIRIE (239) à partir de *Brucella melitensis*, et par DAVIES (80) à partir de *Shigella dysenteriae*; WESTPHAL, LÜDERITZ et coll. (118, 397, 403, 404, 405) les ont étudiées dans d'autres espèces.

Les premières études analytiques de ces composés furent entreprises par BOIVIN et MESROBEANU (29, 30, 233), puis par SHEAR (337). Plus récemment, IKAWA, NIEMANN et coll. (164, 165) ont étudié en détail la composition du lipide A extrait d'un lipopolyoside d'*Escherichia coli*. Ce lipide se trouve hydrolysé par l'acide chlorhydrique 5 N à +100°C pendant 15 heures. Un épuisement par l'éther enlève les acides gras libres, tandis que les composés azotés restent dans la solution aqueuse. On a pu isoler, à partir de la solution étherée, les acides laurique et palmitique, les acides myristique et D-(—) β oxymyristique, constituants habituels des cires (164). La chromatographie sur papier des produits solubles dans l'eau a permis d'identifier la D-glucosamine, l'éthanolamine ou cholamine, les acides phosphorique et aspartique, enfin la nécrosamine (165).

(*) Sel tétrasodique de l'acide éthylène-diamine-tétracétique.

(**) Mélange d'alcoylsulfates secondaires.

La « nécrosamine » ou 4-5 diamino-N-eicosane, dont la structure est la suivante :



a pu être cristallisée à l'état de chlorhydrate, de picrate et de dithiocarbamate. C'est le premier dérivé diaminé d'hydrocarbure aliphatique à longue chaîne que l'on ait rencontré, jusqu'à présent, à l'état naturel. On y trouve en outre des substances non identifiées dont une partie réagit à la ninhydrine tandis qu'une autre partie réduit l'argent.

WESTPHAL et coll. (118, 393, 403) ont isolé à leur tour, les constituants azotés du lipide A d'*Escherichia coli* (Kröger) et *Salmonella abortus equi*, en utilisant la chromatographie sur papier et l'électrophorèse sur papier sous haute tension. Ils ont retrouvé sensiblement les mêmes résultats que NIEMANN, mais ont cependant identifié en plus l'acide glutamique. Ils ont également mis en évidence la présence de glycérine dans les lipides A des deux espèces. WESTPHAL (403) a noté que dans tous les lipides A étudiés jusqu'à présent, on trouve toujours, à côté de l'hexosamine, un acide aminé dicarboxylique. Il en déduit que dans les complexes glucido-lipido-protéiques initiaux, l'hexosamine constitue le lien intermédiaire entre le polyoside et le lipide proprement dit, tandis que l'acide aminé dicarboxylique servirait de lien entre ce lipide et la protéine. Cette hypothèse sera discutée à propos de la structure de la paroi ectoplasmique.

Si on pratique une hydrolyse plus ménagée du lipopolyoside par un acide minéral dilué, on observe, au début du chauffage, une clarification de la solution qui était d'abord opalescente. Une neutralisation par la soude provoque alors la précipitation d'un composé de nature lipidique, appelé lipide A₁, insoluble dans le chloroforme mais soluble dans la pyridine, et qui constitue 41 % du lipopolyoside de *Salmonella abortus equi* (403). Il contient de la D-glucosamine (9,3 %) mais aussi du galactose, à l'exclusion des autres constituants glucidiques du lipopolyoside. En poursuivant l'hydrolyse acide de ce lipide A₁ on aboutit au lipide A, le galactose et des produits azotés se trouvant libérés. On constate cependant, qu'au cours de cette transformation la glucosamine reste liée à la fraction lipidique; elle n'est libérée que par hydrolyse prolongée en présence d'acide chlorhydrique 6 N. Ainsi rencontre-t-on une certaine quantité d'hexosamine aussi bien dans le polysaccharide exempt de lipide (ou polysaccharide dégradé), obtenu

après hydrolyse, que dans le lipide lui-même. C'est le cas pour *Salmonella abortus equi* et *Escherichia coli* où 50 % environ de l'hexosamine font partie du polysaccharide (403).

Lipide A et complexes artificiels.

MORGAN (249, 251, 253) a découvert que le lipopolyoside, qu'il appelle polysaccharide non dégradé, et les protéines conjuguées du complexe antigénique des bactéries à Gram négatif, peuvent s'unir pour donner des complexes artificiels. Il a montré également que le lipopolyoside des bactéries à Gram négatif peut s'unir à d'autres protéines telles que la vitelline, la stromatine ou les globulines du sérum. WESTPHAL et coll. (398, 405) ont confirmé ces observations pour des lipopolyosides préparés par le procédé phénol-eau. Cette union s'est faite chaque fois qu'une des fractions contenait un lipide du type lipide A. Ils ont pu constater, d'autre part, qu'à condition de les traiter pendant un temps bref avec un alcali dilué à + 37°C ou dans du tampon phosphate de pH 7,8 à + 100°C, les lipopolyosides acquièrent une grande affinité pour les protéines et les lipides et, tout particulièrement, pour le cholestérol (404). Dans ces complexes, la protéine ou le lipide ne réagissent plus avec leurs précipitants spécifiques (215). Ainsi, le lipopolyoside d'*Escherichia coli* 08, après « activation », peut fixer cent fois son poids de cholestérol (qui n'est plus précipitable par la digitonine), ou dix fois son poids de caséine (qui ne précipite plus par les acides, même l'acide trichloracétique).

D'une manière analogue, les lipopolyosides « activés » acquièrent une grande affinité pour la surface des érythrocytes, lesquels deviennent alors agglutinables par des antisérums spécifiques (261). Cette technique d'héماغglutination permet de détecter de faibles quantités d'endotoxine (environ 0,1 à 1 µg/cm³) (258, 259, 260).

La nature de l'« activation » n'a pas encore été éclaircie. Cependant, comme l'on sait que le chauffage ménagé et le traitement en milieu alcalin ont pour effet de libérer une fraction lipidique manifestement facile à détacher (203), on peut penser qu'il s'agit là du lipide B et que l'« activation » ne serait autre chose que le démasquage, sur le lipopolyoside, d'un site normalement occupé par le liquide B.

Propriétés biologiques du lipide A.

Au cours de l'étude de la toxicité de l'endotoxine de *Shigella paradysenteriae*, GOEBEL et coll. (24, 366) ont constaté que l'hydrolyse acide des complexes glucido-lipido-protéiques conduit à un

élément polysidique exempt de lipides, non toxique, et à une protéine toxique; alors que l'hydrolyse alcaline donne un lipopolyoside toxique et une protéine non toxique. WESTPHAL et coll. (118, 403, 404, 405) ont montré que les groupements actifs responsables de la toxicité et de la pyrogénicité sont associés au lipide A. En fixant un tel constituant sur une protéine indifférente, comme la caséine ou la sérumalbumine, ils ont obtenu une lipoprotéine artificielle hautement pyrogène et toxique.

On sait que l'injection à des animaux de bactéries à Gram négatif non pathogènes, ou pathogènes mais tuées, ou encore de lipopolyosides bactériens, provoque pendant une période de quelques minutes, une baisse de résistance de l'organisme, suivie d'une augmentation secondaire de la résistance contre les infections expérimentales (98, 99, 204, 205, 305, 306, 330). On explique ce phénomène par un blocage momentané de la properdine, suivi d'une augmentation du taux de cette substance douée de propriétés d'antivirulence. HOWARD, ROWLEY et WARDLAW (160) attribuent cet effet à la présence du lipide A. WESTPHAL et coll. (405) ont confirmé cette hypothèse, en montrant que l'injection de lipide A pur produit chez l'animal une augmentation significative de la résistance non spécifique à l'infection, sans phase négative préalable.

Ces mêmes auteurs ont montré, d'autre part, que le lipide A était responsable des effets endotoxiques des complexes antigéniques. En fait, le lipide A et son précurseur A₁ sont en eux-mêmes peu toxiques. On a attribué ce fait à leur faible solubilité dans l'eau. Effectivement, si on disperse le lipide A au moyen d'un émulsionnant comme le Tween, son activité croît de plus de dix fois (403). Cependant, des solutions colloïdales de lipide A pur, obtenues à l'aide d'« Aérosol OT », injectées par voie intraveineuse, se sont montrées relativement peu toxiques pour la souris, et provoquent une augmentation de la résistance analogue à celle que donne le lipopolyoside correspondant, plus complexe et plus toxique (404).

Du fait de son pouvoir inflammatoire, le lipide A, sous forme dispersée, peut, tout comme les lipopolyosides bactériens, se comporter comme un adjuvant très efficace lorsqu'on veut obtenir la formation d'anticorps à l'aide d'antigènes protéiques (171).

Coloration des lipides bactériens.

Les méthodes décrites jusqu'à présent concernent les lipides intracellulaires. Elles consistent à fixer d'abord les bactéries par la chaleur, puis à les traiter, en général, par du Noir Soudan

B (43, 141). On peut éventuellement faire un contraste à l'aide de la safranine ou de la fuchsine (43).

Les colorants spécifiques des lipides sont peu nombreux. Ce sont tous des azoïques : Noir Soudan B et Rouge Soudan (de l'I.G. Farben Industrie) ; Ecarlate et Bleu B.Z.L. (de Ciba). Ils sont tous insolubles dans l'eau et solubles dans les corps gras, ainsi que dans leurs solvants. En réalité, il ne s'agit pas de colorants proprement dits, étant donné qu'ils n'ont pas d'affinité tinctoriale pour les fibres textiles ; ce sont des corps colorés qui communiquent leur coloration aux lipides par un simple phénomène de dissolution. Pour cette raison ils sont spécifiques des corps gras (206).

CHAPITRE III

ORGANISATION DE LA PAROI

1. — PROCÉDÉS D'INVESTIGATION

Nos connaissances sur l'organisation macromoléculaire des parois ectoplasmiques ne proviennent pas exclusivement de l'analyse chimique. L'étude de l'action des détergents, des antibiotiques et surtout des enzymes, s'est révélée fructueuse. La détermination de la constitution des substrats attaqués par les enzymes actifs constitue un moyen d'analyse élégant et deviendra même, sans doute, la méthode de choix « le jour où on pourra digérer par plusieurs enzymes s'attaquant spécifiquement à des liaisons différentes, la paroi d'un microbe déterminé » (322).

Action des détergents.

On peut classer les détergents en trois groupes, suivant la charge électrique de leur constituant hydrophobe; on distingue donc les détergents anioniques, cationiques et non ioniques. Or, des études électrophorétiques ont montré que les bactéries vivantes ont, très habituellement, une charge nette électrique négative, qu'elles soient à Gram positif ou à Gram négatif (101). Aussi, comme on pouvait le prévoir, les détergents cationiques se fixent plus facilement sur la surface bactérienne dont ils neutralisent les charges, ce qui provoque ordinairement une agglutination des bactéries (33). De plus, ils se révèlent extrêmement toxiques pour celles-ci, quel que soit leur comportement vis-à-vis de la coloration de Gram (13, 14.

124, 207). Les composés anioniques, par contre, ne tuent que rarement les bactéries à Gram positif et n'altèrent pas la vitalité des bactéries à Gram négatif (124, 207); quant aux détergents non ioniques, ils ne possèdent pas d'activité bactéricide (92) et peuvent même se comporter comme des stimulants de la croissance bactérienne, notamment en neutralisant certaines substances inhibitrices (32, 36).

La diversité des propriétés chimiques des détergents permet de prévoir que l'action de ces derniers sur les bactéries sera complexe (157, 263, 276). Ceux-ci peuvent, en effet, dénaturer les protéines (290), inhiber la plupart des enzymes (411), modifier les lipides aux interfaces (276, 332) et altérer la perméabilité cellulaire (1, 241, 243), tous phénomènes susceptibles de désorganiser la vie de la cellule. On a constaté que les substances qui diffusent sous l'action des ammoniums quaternaires possèdent un maximum d'absorption à 260 m μ (307); mais, comme ces substances ne donnent pas la réaction du biuret, on pense qu'il ne s'agit pas de nucléoprotéines, mais de composés à faible poids moléculaire. Des bactéries traitées par du C.T.A.B. (*), par exemple, libèrent dans le milieu ambiant des acides aminés, du phosphore inorganique, des composés puriques et pyrimidiques (333).

Au point de vue cytologique, les lésions provoquées par les composés tensio-actifs ont fait l'objet de diverses études à l'aide du microscope électronique. Les observations les plus anciennes (102, 173, 231, 240) font état d'une contraction marquée de la masse protoplasmique à l'intérieur de la paroi, sans que cette dernière offre de solutions de continuité évidentes. Cette contraction concomitante à l'exosmose des constituants solubles du protoplasme est imputable, sans doute, à une altération de la barrière semi-perméable. Ces observations, de même que celles qui ont été faites lors de l'action de certains antibiotiques basiques, notamment des polymyxines (262, 333), sont à rapprocher de celles de COLOBERT et LOUISOT (63). D'après ces auteurs, il s'agirait d'une véritable réaction non spécifique, provoquée par toute substance capable de se fixer à la surface des bactéries. Le Teepol, le Tergitol 7, le déhydrocholate de sodium, le Catigène et la saponine (**), provoquent cette réaction caractéristique, aussi bien que le vieillis-

(*) Bromure de cétyl-triméthylammonium.

(**) Le *Teepol* (mélange d'alcoylsulfates secondaires), de même que le *Tergitol 7* (diéthyl-3-9 tridécanyl 6-sulfate de sodium) et le *déhydrocholate de sodium* sont des détergents anioniques, alors que le *Catigène* (chlorure de dodécyl-diméthyl-benzyl ammonium) est cationique et la *saponine* (hétéroside dont la sapogénine est de nature stérolique) n'est pas ionique.

sement des bactéries, les radiations γ du cobalt radioactif, le chauffage ménagé, les solutions salines, l'hyaluronidase ou le lysozyme, dans les conditions où l'activité lytique ne peut se manifester.

Il est certain qu'une bactérie représente un organisme trop complexe pour qu'on puisse préciser par l'étude cytologique quelle est l'influence des détergents. Aussi, plusieurs auteurs (33, 327) ont-ils étudié, plus spécialement, l'action de ces derniers sur la paroi bactérienne isolée, ce qui a permis d'obtenir des renseignements sur la structure de celle-ci.

SALTON (327) a montré que la quantité de détergent cationique absorbé par la paroi isolée, dépend de la quantité de lipides qui s'y trouve. Alors que les parois à Gram positif sont insolubles dans des solutions à 2 % de détergent cationique ou anionique à + 37°C, les parois à Gram négatif, en revanche, sont rapidement dissoutes par un détergent anionique comme le laurylsulfate de sodium. Connaissant l'action dénaturante des détergents sur les protéines et les lipoprotéines, on n'a pas manqué d'attribuer cette différence au fait que les parois des bactéries à Gram négatif sont plus riches en lipoprotéines que celles des bactéries à Gram positif; cependant, d'autres interprétations paraissent possibles, et COLOBERT a interprété la sensibilisation des salmonelles au lysozyme provoquée par le Teepol (55), par une délipidation partielle de la paroi bactérienne. Ses observations (55) sont analogues à celles de BOLLE et KELLENBERGER (33) qui ont étudié la lyse d'une suspension de parois isolées d'*Escherichia coli* par une solution à 0,2 % de laurylsulfate de sodium : la turbidité baisse rapidement en quelques minutes pour atteindre un palier dû à l'insolubilité d'une fraction des parois. Ayant analysé, par chromatographie après hydrolyse, le résidu insoluble, BOLLE et KELLENBERGER ont trouvé que sa composition en acides aminés est la même que celle de la fraction insoluble dans le phénol à 90 % décrite par WEIDEL et PRIMOSICH (392) :

« Ces composants sont l'acide diaminopimélique, l'acide glutamique, l'acide muramique, la glycine, l'alanine, la glucosamine et la lysine. c'est-à-dire ceux qui font partie du mucocomplexe de la paroi, commun aux espèces à Gram positif et à Gram négatif » (33).

L'examen au microscopie électronique montre que l'action du laurylsulfate de sodium s'accompagne d'un amincissement de la paroi.

Partant de ces observations, BOLLE et KELLENBERGER (33) proposent d'expliquer l'action des détergents de la manière suivante. Ceux-ci agiraient au niveau de la paroi ectoplasmique en dissolvant et en dénaturant les composés lipoprotéiques; ces derniers

seraient remplacés au fur et à mesure de leur destruction par des processus de synthèse accélérée. Si cette synthèse est bloquée, par suite d'un arrêt du métabolisme, les détergents deviennent bactéricides et acquièrent des propriétés lytiques vis-à-vis de certaines souches à Gram négatif. Cette condition est réalisée directement par les détergents cationiques qui sont eux-mêmes des inhibiteurs du métabolisme (13, 14). En revanche, dans le cas des anioniques, on n'obtient le même résultat qu'à condition d'arrêter artificiellement le métabolisme de la bactérie par l'addition d'une concentration juste bactériostatique d'un antimétabolite tel que le cyanure de potassium, le dinitrophénol, l'acide fluoracétique, l'acide malonique ou le Merfen (33) (*).

Action de la pénicilline.

La pénicilline n'agit pas sur les formes végétatives des bactéries, mais uniquement sur les cellules en cours de croissance ou de division. A faible concentration, elle provoque la formation, chez les bactéries à Gram négatif, de longues formes filamenteuses et son effet bactériostatique s'expliquerait alors par une inhibition de la division cellulaire.

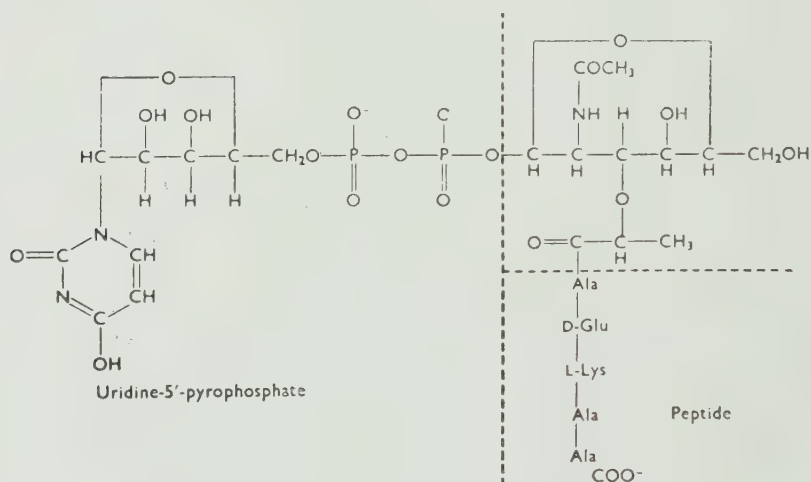
A dose toxique, la pénicilline provoque des troubles de la formation de la paroi ectoplasmique, ce qui se traduit par une fragilité osmotique de la bactérie, qui suffit à expliquer en partie l'effet bactéricide de la pénicilline *in vitro*. LEDERBERG (208, 209) a montré que si on fait agir celle-ci sur *Escherichia coli*, dans un milieu de tonicité convenable, le protoplasme ne se disperse pas; mais les bacilles se transforment en formes sphériques. D'après l'auteur, la paroi ectoplasmique aurait complètement disparu et il se serait formé des protoplastes, qui se lysent si l'on fait baisser la pression osmotique du milieu. Si on repique ces protoplastes sur un milieu ne contenant pas de pénicilline, ils redonnent des bactéries normales. Ces résultats ont été confirmés depuis par HAHN et CIAK (137); mais le terme de protoplasme paraît avoir été employé abusivement (65). Notamment, SALTON et SHAFI (327), partant des connaissances actuelles sur la structure de la paroi ectoplasmique, ont cherché à démontrer que l'action de la pénicilline ne conduit pas à la disparition complète de la paroi et que les formes rondes observées par LEDERBERG ne sont pas comparables aux protoplastes obtenus par action du lysozyme sur *Bacillus megaterium*.

(*) Borate de phénylmercure.

Au point de vue de la composition chimique, la paroi ectoplasmique des bactéries à Gram positif est, dans beaucoup de cas, constituée uniquement de mucocomplexes contenant un petit nombre d'acides aminés, de l'acide muramique, de la glucosamine et, parfois, de la galactosamine (71, 72, 320, 321, 419). Au contraire, la paroi ectoplasmique des bactéries à Gram négatif contient à la fois des lipoprotéines et un mucocomplexe (326, 392). On a établi récemment que c'est ce mucocomplexe qui est responsable de la rigidité structurale de la paroi (326, 392). SALTON et SHAFI (327) ont entrepris de vérifier si la pénicilline modifie à la fois ces deux types de constituants. Après avoir cultivé *Vibrio metchnikovi* sur un milieu contenant de la pénicilline, ils ont isolé la « paroi » par désintégration mécanique ou par lyse osmotique. Grâce au microscope électronique, ils ont pu mettre en évidence, tant sur les formes rondes des bactéries que sur les « parois » isolées, l'existence de deux couches concentriques. L'une, interne, ne serait autre que la membrane cytoplasmique; l'autre, externe, représenterait la structure résiduelle de la paroi ectoplasmique, privée du constituant responsable de la rigidité par l'action de la pénicilline (327). L'existence d'une double frontière est confirmée par les caractères de la plasmolyse des formes sphériques dans du chlorure de sodium 5 M : il y a contraction du protoplasme à l'intérieur d'un corps en forme de croissant entouré d'une paroi sphérique (327). Par l'utilisation de méthodes sérologiques, SALTON et SHAFI (327) ont pu confirmer la persistance de certains constituants de la paroi ectoplasmique après action de la pénicilline : un immun sérum spécifique de *Salmonella gallinarum* agglutine également les « parois sphériques » obtenues sous l'influence de l'antibiotique, mais à un titre plus faible que les parois normales.

L'étude biochimique, tout en précisant le mode d'action de la pénicilline, a permis de vérifier certaines hypothèses sur la structure de la paroi ectoplasmique des bactéries. De nombreux auteurs (220, 270, 271, 272, 273, 359, 360) avaient signalé à différentes reprises, que des bactéries traitées par la pénicilline accumulent dans leur cellule des nucléotides uridiniques acido-solubles. La durée du temps de latence qui s'écoule après l'addition de pénicilline et l'existence d'un seuil de concentration en antibiotique, font penser que l'accumulation de nucléotides uridiniques est un des effets spécifiques de la pénicilline, qui signe la nature de l'altération métabolique provoquée par l'antibiotique (271, 273, 360, 363).

Certains de ces nucléotides uridiniques ont pu être isolés et identifiés (271). Dans *Staphylococcus aureus* traité par la pénicilline, s'accumule principalement un uridine — 5' — pyrophosphate, lié à de l'acide muramique et à un peptide constitué d'acide D glutamique, de L lysine et de D-L alanine, dans les proportions respectives de 1/1/1/3 (273).



La séquence des acides aminés de ce peptide est une des séquences possibles indiquées par STROMINGER (359, 361).

On a pensé que la vitesse d'accumulation de ces nucléotides, en présence de pénicilline, était celle avec laquelle ils sont métabolisés dans des conditions normales, et qu'ils devraient intervenir dans une des étapes principales de la formation de la paroi (271, 360, 362, 363) ; d'autant qu'on sait maintenant que des nucléotides uridiniques se comportent comme des précurseurs dans la biosynthèse des mucopolysides (93).

La grande similitude de structure existant entre le chaînon peptidique isolé de la paroi (p. 39) et celui du nucléotide urinique, nous paraît tout-à-fait remarquable. STROMINGER et collaborateurs (273) ont même retrouvé dans les parois normales de *Staphylococcus aureus* de l'acide muramique, de l'acide glutamique, de la lysine et de l'alanine dans un rapport voisin de 1/1/1/3, qui est précisément celui que l'on rencontre dans le nucléotide décrit. La pénicilline aurait donc empêché l'incorporation dans la paroi de ce peptide contenant de l'acide muramique, la nucléotide jouant le rôle de donateur.

Ayant entrepris l'analyse chimique des « parois » isolées à partir des formes rondes induites par la pénicilline chez *Vibrio metchnikovi* et *Salmonella gallinarum*, SALTON et SHAFI (327) ont constaté que, chez ces deux espèces, les effets de la pénicilline se manifestaient par une réduction du taux de glucides aminés et d'acide diaminopimélique (la perte se situant entre 30 et 50 % par rapport aux parois normales). En revanche, ils n'ont observé aucune diminution du taux de polysides et de lipides, ni de différences qualitatives soit dans les principaux glucides présents dans l'hydrolysate, soit dans les acides aminés N terminaux.

Cette diminution parallèle, dans la paroi, du taux de sucres aminés et d'acide diaminopimélique, les a conduit à penser que le constituant affecté par la pénicilline est semblable au chaînon structural attaqué par le système enzymatique du bactériophage (392), et aussi au substrat du lysozyme (326). En effet, la digestion par cet enzyme, de la paroi d'un certain nombre de bactéries à Gram négatif, enlève la plus grande part de l'acide muramique et de l'acide diaminopimélique, laissant une structure insoluble dont la teneur en glucides aminés est réduite (326). Cette hypothèse est en accord avec le fait que le lysozyme provoque une diminution de l'opacité d'une suspension de parois de bactéries normales, alors qu'on n'observe pas de diminution de cette opacité si on le fait agir sur les parois des formes sphériques des mêmes bactéries, induites par la pénicilline. D'autre part, le lysozyme ne fait pas baisser davantage la teneur en glucides aminés de ces formes sphériques (327).

Bien que l'étude du mécanisme de l'action de la pénicilline n'entre pas dans le cadre de cet exposé, nous rappellerons cependant que certains auteurs comme SALTON et LEDERBERG pensent qu'elle agirait, soit en inhibant la biosynthèse ou l'incorporation du peptide dans la paroi (209, 327), soit en bloquant une transglucosidase spécifique au niveau de la membrane cytoplasmique (273), soit encore en occupant le site accepteur dans la paroi (273). D'autres, comme PRESTIDGE et PARDEE (284), pensent qu'elle agirait indirectement, en induisant la formation d'un enzyme capable de lyser la paroi. Pour le moment, aucune de ces hypothèses n'a été parfaitement vérifiée.

Action des Enzymes.

ENZYMES PROTÉOLYTIQUES.

Nous avons signalé que de nombreux auteurs ont utilisé des enzymes protéolytiques — notamment la trypsine et la pepsine —

soit pour isoler les parois ectoplasmiques de bactéries préalablement chauffées, soit pour purifier des parois déjà isolées par d'autres méthodes. Nous avons noté et discuté le fait que l'efficacité de ce traitement dépend, avant tout, de la constitution chimique de la paroi.

Le résidu insoluble obtenu en traitant par des enzymes protéolytiques des bactéries préalablement soumises à un chauffage modéré, est constitué essentiellement par les parois ectoplasmiques (315). On sait, en effet, que les parois bactériennes isolées résistent à ce traitement (71, 318). WORK (419) a suggéré que cette propriété pourrait être due à la forte proportion d'isomères D des acides aminés qu'elles contiennent. Cependant, pour STRANGE (357), cela s'expliquerait aussi bien par l'absence, dans la paroi, de certaines liaisons d'amino-acides spécifiquement hydrolysables par les enzymes protéolytiques utilisés.

Si le traitement par les enzymes protéolytiques ne modifie pas morphologiquement les parois, il n'est pas certain qu'il ne les modifie pas chimiquement. Elles subissent parfois une perte de poids qui peut atteindre 45 % (144). On peut supposer que certains constituants de surface, comme les antigènes protéiques, peuvent être hydrolysés. C'est le cas, par exemple, de la protéine M du Streptocoque hémolytique (201). Le traitement peut, d'autre part, éliminer des résidus cytoplasmiques, ce qui se traduit finalement par une simplification apparente de la composition en acides aminés de la paroi (71). WORK (419) explique ainsi pourquoi le nombre d'acides aminés trouvé par CUMMINS et HARRIS (72) est beaucoup plus faible que celui trouvé par SALTON (312, 314, 323) et d'autres auteurs qui ont purifié par de simples lavages avec des solutions salines, des parois obtenues par broyage mécanique. Le traitement des parois par les enzymes protéolytiques donne, peut-être, une fausse impression de simplicité.

D'autres observations apportent la preuve que ces enzymes provoquent des modifications de structure de la paroi. COLOBERT (55, 60) a constaté que les parois des salmonelles obtenues après un chauffage ménagé suivi d'une trypsination, se dissolvent complètement dans le *Teepol*; alors que les mêmes parois demeurent insolubles si elles n'ont pas subi l'action de la trypsine. De son côté, WEIDEL (390) a remarqué que les parois d'*Escherichia coli* B traitées par la trypsine absorbent encore les phages T₂, T₄ et T₆, et, parfois, les phages T₃ et T₇. En revanche, elles ont entièrement perdu leur faculté d'absorption de T₁ et T₅. WEIDEL ne donne pas d'explications précises à ces phénomènes.

Malgré ces inconvénients, le traitement par les enzymes protéolytiques constitue une excellente méthode de préparation des parois. Il est certain qu'il conserve chez celles-ci la structure fondamentale (419). Ainsi, SALTON et SHAFI (327) ont montré que la teneur en acide diaminopimélique et en acide muramique ne subit aucune variation après un traitement par la trypsine. Or ces deux constituants fondamentaux sont les principaux facteurs responsables de la rigidité pariétale. Ces résultats sont confirmés par ceux de CUMMINS et HARRIS sur les bactéries à Gram négatif (72) .

Il paraît possible de conclure avec SALTON (318) que les enzymes protéolytiques ne digèrent que les protéines superficielles des parois ectoplasmiques. L'intérêt de leur utilisation n'est pas dans les constituants qu'ils dissolvent mais dans les fractions qui résistent à la digestion.

WELSCH (394, 395) a consacré des articles importants à l'action des protéases et peptidases bactériennes sur les parois. En réalité, il s'agit souvent de mélanges complexes d'enzymes dont on n'a pas encore identifié tous les constituants. D'autre part, on ne connaît pas avec certitude leur mode d'action. Seuls l'actinomycétine et ses constituants isolés ont donné des résultats analytiques intéressants dans le cas des bactéries à Gram positif (322).

LYSOZYME

Le nom de « lysozyme » a été donné par FLEMING (110), en 1922, à un enzyme qui possédait la propriété remarquable de dissoudre les sarcines. On a constaté par la suite que des substances de ce type étaient très répandues dans la nature, puisqu'on les rencontre aussi bien chez l'homme que chez les animaux et les végétaux (111, 236). Leur présence a même été mise en évidence chez certaines bactéries (297). On pense également que les bactériographes leur doivent la propriété de pouvoir dissoudre les parois bactériennes (194). Les sources les plus abondantes de lysozyme sont le latex du papayer (*Carica papaya*) et de certains *Ficus*. Le blanc d'œuf de poule en contient également des quantités extraordinairement importantes (de l'ordre de 9 %) et, parce qu'il est facilement accessible, il en est devenu la source principale (2). Le lysozyme de l'œuf est, de beaucoup, le plus étudié.

Le lysozyme, protéine basique, constitue des complexes insolubles avec un grand nombre de substances de charge électrique opposée, par exemple, avec les alcoylsulfates, les acides nucléiques, la gomme arabique, l'héparine, les polysides animaux, végétaux ou bactériens et la plupart des protéines (321, 333). Pour les mêmes

raisons électrostatiques, le lysozyme s'adsorbe à la surface de toutes les bactéries dont la charge électrique nette est habituellement négative dans la zone des pH neutre et alcalins (101). Chez quelques rares espèces, le lysozyme provoque alors la lyse par destruction de la paroi ectoplasmique et dispersion consécutive du protoplasme. Les parois des autres espèces ne paraissent pas modifiées; mais l'adsorption du lysozyme n'en entraîne pas moins un certain nombre de modifications physiologiques (exosmose de certains constituants cytoplasmiques (333)), et d'altérations morphologiques portant sur le protoplasme. Celles-ci ne sont nullement spécifiques et, d'après COLOBERT et LOUISOT (63), elles seraient provoquées par toute agression, toute condition physico-chimique défavorable et constitueraient, en quelque sorte, une « réaction d'alarme » pour la bactérie. Ces phénomènes, qui paraissent avoir souvent été mal interprétés, ont été parfois décrits comme spécifiques du lysozyme.

La fixation électrostatique du lysozyme à la surface des bactéries peut se traduire par un « gonflement de la capsule » (57), la protéine formant un complexe insoluble avec les produits de sécrétion chargés négativement. Cette fixation non spécifique peut également entraîner la neutralisation de la charge électrique de la surface et provoquer ainsi l'agglutination des bactéries (192, 315, 368); une simple élévation de la force ionique suffit, en général, à inhiber la formation de pareils complexes ou à les détruire s'ils se sont déjà constitués.

L'action véritablement spécifique du lysozyme sur les bactéries sensibles, est de nature enzymatique et se traduit par la dissolution de la paroi ectoplasmique rigide (313, 372, 396). Ce phénomène s'accompagne, en général, de la diffusion des constituants cytoplasmiques dans le milieu. On observe donc une clarification de la suspension bactérienne que l'on peut suivre au photomètre (313, 315, 317). Cependant, WEIBULL (389) a démontré que cette clarification ne se produit plus si l'on opère dans un milieu de pression osmotique convenable. La bactérie dépouillée de sa paroi, prend alors une forme sphérique parfaitement stable et qui paraît constituée de la totalité de la masse protoplasmique. A ces corps sphériques qui n'ont plus de paroi ectoplasmique (65, 122), on a donné le nom de *gymnoplastes* (346, 347) ou *protoplastes* (40). Il semble que les protoplastes soient constitués uniquement du protoplasme, limité par la membrane cytoplasmique. Lorsque la pression osmotique baisse, le protoplaste se lyse et le contenu protoplasmique diffuse dans le milieu; il ne persiste que l'enveloppe externe, sous forme d'un sac vide, constituant une sorte de fantôme de la bactérie.

Pour la plupart des auteurs, cette enveloppe n'est pas autre chose que la membrane cytoplasmique dans son état naturel. Mais, COLOBERT (61) pense qu'elle ne représente, en réalité, qu'un complexe artificiel formé entre le lysozyme et le protoplasme.

Les espèces bactériennes directement lysables par le lysozyme sont peu nombreuses; les plus anciennement connues appartiennent aux genres *Sarcina* et *Bacillus*, mais on en rencontre également chez les actinomycètes et streptomycètes. La sensibilité varie suivant l'espèce et, pour une même espèce bactérienne, on peut observer des différences importantes suivant les souches et les conditions de culture (123, 210).

SALTON (326) a montré que le lysozyme attaque directement les parois isolées de nombreuses autres bactéries à Gram positif, notamment celles de *Micrococcus varians*, *Micrococcus tetragenus*, *Micrococcus roseus*, *Staphylococcus citreus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Sporosarcina ureae*, et, plus partiellement, celles de certaines espèces à Gram négatif, notamment *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Chlorobium thiosulfatophilum*, *Vibrio metchnikovi*. EPSTEIN et CHAIN avaient d'ailleurs déjà observé la lyse de *Brucella abortus* par le lysozyme (105).

Il ressort de ces expériences que de nombreuses bactéries contiennent dans leur paroi un substrat du lysozyme. C'est le cas, en particulier, d'un grand nombre d'espèces à Gram négatif, bien qu'elles ne soient pas directement lysables. Chez ces bactéries, le substrat serait normalement inaccessible à l'enzyme; elles ne peuvent être lysées qu'à condition de leur faire subir un traitement préalable susceptible de « démasquer » le substrat (60).

De nombreux procédés ont été utilisés pour obtenir ce résultat. La technique préconisée par NAKAMURA (257), consiste à faire agir le lysozyme à pH 3,5, puis à élever brusquement le pH à 10 par addition de soude. Des résultats analogues ont été obtenus par l'emploi de butanol (142), de chloroforme (380), d'acétone (385), d'une substance tensioactive comme le Teepol (59), des radiations ultraviolettes (4) et de la polymixine (262, 386). REPASKE (294, 295) a préconisé un procédé qui s'est révélé très général, et qui consiste à faire agir le lysozyme en tampon tri-hydroxyméthyl-aminométhane de pH 8 avec de l'acide éthylène-diamine-tétracétique. On obtient le même résultat en traitant les bactéries par une résine échangeuse de cations, le Dowex 50 (295). En 1957, COLOBERT (55, 58, 59, 60) a prouvé que les salmonelles pathogènes pour l'homme contiennent dans leur paroi un substrat du lysozyme, et qu'un

traitement ménagé par la chaleur sensibilise ces bactéries à l'enzyme.

Cet effet du chauffage avait déjà été observé par CALIFANO (44) puis WARREN, GREY et BARTELL (385). En revanche, SALTON (315), étudiant l'action conjuguée de la trypsine et du lysozyme sur des bactéries chauffées, n'a pas soupçonné l'importance du chauffage dans la lyse observée.

On ne connaît pas encore avec certitude le mécanisme de la « sensibilisation ». COLOBERT (59) a remarqué que le chauffage et le traitement par le Teepol ou l'E.D.T.A. ont pour effet de délipider, au moins partiellement, la paroi des bactéries. Constatant, d'autre part, qu'un grand nombre des procédés reconnus efficaces par d'autres auteurs font appel à des solvants des lipides, il a émis l'hypothèse que la « sensibilisation » consisterait à détacher une fraction lipidique qui masque normalement le substrat spécifique dans la paroi (59). Connaissant les propriétés chélatrices de l'E.D.T.A. et du Dowex 50, REPASKE (295) propose d'expliquer le phénomène par l'arrachage d'un cation de la paroi. *A priori*, ces deux hypothèses ne s'excluent pas. On sait, en effet, que les cations comme Ca^{++} peuvent relier entre eux des lipides par l'intermédiaire de chaînons phosphorés, comme on l'a observé dans le stroma des hématies. SALTON (326) pense qu'en réalité il y aurait une désagrégation des composés lipoprotéiques de la surface bactérienne. D'après lui, l'ordre décroissant de sensibilité au lysozyme des bactéries à Gram négatif est le suivant : groupe I, *Salmonella*, *Brucella*; groupe II, *Klebsiella*, *Shigella*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Erwinia*, *Escherichia*; groupe III, *Vibrio*, *Proteus* (321).

De nombreux auteurs ont cherché à isoler et à identifier ce substrat, en partant de diverses espèces bactériennes. Déjà en 1929, HALLANER (138) admettait que le substrat du lysozyme devait être une « glycoprotéine », hypothèse qui devait être confirmée par la suite. En 1936, MEYER (234) a montré que l'action du lysozyme sur les sarcines et sur des mucoïdes extraits de ces bactéries, s'accompagne de la libération de sucres réducteurs et de N-acétyl-hexosamines. Constatant d'autre part, que le substrat en solution présentait une diminution de viscosité considérable, l'auteur attribua ce phénomène à une dépolymérisation précédant l'hydrolyse. Ces résultats ont été vérifiés par EPSTEIN et CHAIN (105) puis par PIRIE (278). Par la suite, MEYER et HANEL (235) ont réussi à obtenir un substrat plus pur. La difficulté était de le rendre soluble; ils y sont parvenus en traitant *Micrococcus lysodeikticus* par de la soude 0,5 N sous atmosphère d'azote. Cette méthode de préparation

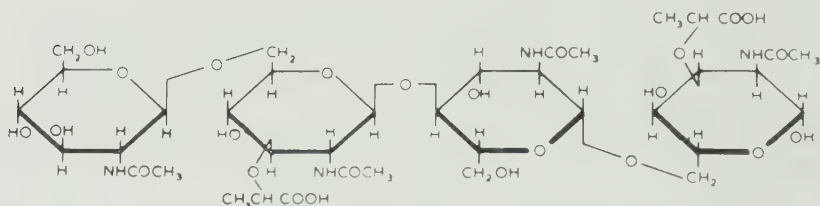
a été perfectionnée depuis par SCHUTTE et KRISH (334). Enfin, COLOBERT et DIRHEIMER (67), reprenant ces travaux, ont pu obtenir récemment un substrat hautement purifié, par fractionnement sur une colonne de diéthylaminoéthylcellulose.

Etudiant la réaction enzymatique du lysozyme sur son substrat, les auteurs, pendant longtemps, n'ont fait état que de la libération de sucres réducteurs (105, 235) et de N-acétylhexosamines (235), ou de la diminution de viscosité du substrat dissous (235). C'est le mérite de SALTON (319) d'avoir entrepris l'étude des divers constituants libérés.

Le lysozyme provoque la dissolution complète des parois de *Micrococcus lysodeikticus*, *Sarcina lutea* et *Bacillus megaterium*. On obtient un mélange complexe de fragments non dialysables, qui diffèrent en particulier, par leurs propriétés électrophorétiques et par leur dimension — leur poids moléculaire varie entre 10.000 et 20.000 (319). La fraction dialysable contient des substances réductrices et donne une réaction positive pour les glucides aminés. SALTON (319) en a isolé le principal constituant, qui s'est révélé être un diose formé d'une molécule d'acétyl-glucosamine et d'une molécule d'acide muramique également acétylé. Récemment, SALTON et GHUYSEN (328) ont mis en évidence, à côté de ce diose, un tétrose constitué par deux molécules de chacun de ces mêmes glucides. En revanche, on n'a pas décelé d'acides aminés libres ni de monoses dans cette fraction (319). La fraction non dialysable contient également des hexosamines N acétylées liées à des peptides (328), et d'autres constituants formés de polysaccharides et de peptides, en proportions variables (319). Le fait que le lysozyme libère une quantité importante d'acétyl-glucosamine et d'acide acétylmuramique fait penser qu'il agirait au niveau du glucopeptide responsable de la rigidité de la paroi, et que WORK (419) appelle l'élément fondamental de structure.

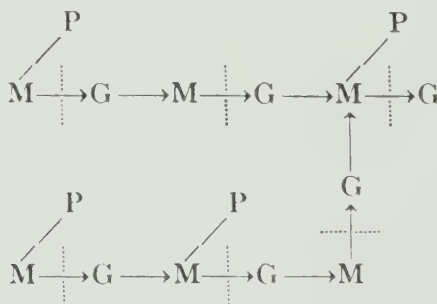
On connaît actuellement, d'une façon assez précise, la nature de la liaison glucosidique détruite par le lysozyme. En faisant agir cet enzyme sur des chitosanes, BERGER et WEISER (21) avaient déjà montré qu'il se comportait comme une β glucosaminidase. Une étude récente de SALTON et GHUYSEN (328) a permis de confirmer cette conclusion et de décrire le mécanisme de la libération des hexosamines par le lysozyme. En effet, par dégradation enzymatique et chimique du diose et du tétrose détachés du substrat, ils ont montré que l'acétyl-glucosamine et l'acide acétyl-muramique se relie entre eux par des liaisons β 1-4 et β 1-6. Le lysozyme coupe une liaison β 1-4, libérant un diose sur lequel l'enzyme n'agit

pas. En revanche, le tétrose libéré est encore hydrolysable par le lysozyme, du fait de l'existence d'une liaison β 1-4. Ce tétrose ne serait donc qu'un produit d'hydrolyse incomplète du substrat (328).



Constitution du tétrose isolé par SALTON et GHUYSEN (328).

Dans l'élément fondamental de structure, la chaîne glucidique se rattacherait au peptide par l'intermédiaire d'une liaison peptidique située entre l'acide muramique et l'alanine (421), liaison déjà observée dans le nucléotide uridinique de PARK et STROMINGER (cf. p. 54).



L'élément fondal de structure (d'après ZILLIKEN (421)).

- M = Acide muramique.
- G = N-acétyl-D-glucosamine.
- P = Fraction peptidique.
- ... = Action du lysozyme.
- M-G = Muraminido-Glucosamine.

Les parois des bactéries à Gram négatif, traitées par le lysozyme, ne sont jamais complètement dissoutes. On n'observe qu'une faible diminution de la turbidité de leurs suspensions (326), le trouble résiduel étant dû aux constituants pariétaux qui résistent à l'action de l'enzyme (55, 136).

L'analyse de la fraction soluble mais non dialysable obtenue, montre qu'elle est constituée principalement d'alanine, d'acide

glutamique, d'acide diaminopimélique et de glucosamine, avec des petites quantités d'acide muramique et d'autres amino-acides. Les constituants insolubles contiennent tous les acides aminés présents dans la paroi, à l'exception de l'acide diaminopimélique qui ne s'y trouve qu'à l'état de traces. Ils contiennent également de la glucosamine, mais très peu d'acide muramique (326).

Le bilan de la réaction enzymatique se traduit donc par l'enlèvement à la paroi insoluble de l'acide muramique et de l'acide diaminopimélique. Si l'on tient compte du fait que les parois des bactéries à Gram négatif comportent une couche interne ayant la composition et la structure de la paroi des bactéries à Gram positif, mais recouverte par une couche externe riche en lipides, on peut penser que l'« activation » consisterait à extraire cette couche externe, démasquant « l'élément fondamental de la structure pariétale », c'est-à-dire la couche interne qui constitue le substrat du lysozyme.

ENZYMES DES PHAGES.

WEIDEL, en 1951 (390), a montré que dans les bactéries, les récepteurs des phages se situent au niveau de la paroi. En effet, des parois isolées d'*Escherichia coli* B absorbent les phages de la série T aussi vite que les bactéries vivantes; leur faculté d'absorption est spécifique et correspond à la possibilité d'infection ou de résistance de la souche dont elles proviennent (390). Les parois utilisées par WEIDEL et coll. ont été préparées par trypsinations répétées de bactéries préalablement soumises à une autolyse en présence de toluène. Ce mode de préparation a légèrement modifié leur activité vis-à-vis de certains phages. Elles absorbent plus activement les phages T₂, T₄ et T₆; mais elles n'ont plus qu'une faible activité vis-à-vis des phages T₃ et T₇, tandis que la faculté d'absorption de T₁ et T₅ a complètement disparu (390).

D'après ces observations, on pouvait penser qu'il existe, au niveau de la paroi ectoplasmique, des sites récepteurs spécifiques de chaque type de phage. Par une série de travaux remarquables, WEIDEL et coll. (193, 194, 390, 391, 392, 393), ont pu identifier les substances réceptrices pariétales et préciser la nature des phénomènes engendrés par l'absorption des phages. Les renseignements qu'ils ont ainsi obtenus sur la structure de la paroi sont d'une très grande importance.

Etudiant le phénomène au microscope électronique et au microscope à contraste de phase, WEIDEL (390) a constaté que l'absorption

de particules de phage T_2 par la paroi isolée d'*Escherichia coli B* se traduit par l'apparition de « taches de destruction » aux endroits où les phages se fixent sur celle-ci. Tout se passe comme si la particule phagique possédait un système enzymatique susceptible de dissoudre la paroi en un point quelconque. Au cours des mêmes expériences, WEIDEL (390) s'est aperçu que les phages paraissent subir également une fusion partielle lors de l'absorption.

Ce dernier phénomène rend difficile l'étude de la réaction enzymatique entrant en jeu, car les produits de dégradation des phages passent eux-mêmes en solution, se mélangeant ainsi aux fragments solubles provenant de la paroi. Cette difficulté a pu être tournée par une méthode de marquage judicieuse (193). Le dinitrofluorobenzène (D.N.F.B.) a la propriété de se fixer sur les fonctions amines primaires de la paroi, communiquant à celles-ci une coloration jaune qui résiste à des lavages répétés. Les parois ainsi marquées conservent les mêmes propriétés réceptrices vis-à-vis des coliphages T_2 , T_4 et T_6 , la vitesse d'absorption de T_4 paraissant même augmentée. Ceci prouve que les fonctions amines primaires de la paroi n'interviennent pas dans l'absorption des phages. Au moyen de ce marquage, on peut voir que l'absorption s'accompagne de la libération de produits colorés en jaune, qui proviennent nécessairement de la paroi. KOCH et WEIDEL (193) ont pu mesurer directement la coloration obtenue au photomètre et montrer que son intensité (qui dépend de la quantité de substances libérée) varie en fonction du nombre de phages absorbés, prouvant ainsi qu'il s'agit d'un phénomène enzymatique.

Après avoir fait agir les coliphages T_2 et T_4 sur des parois isolées d'*Escherichia coli B* préalablement « marquées » par du D.N.F.B., KOCH et WEIDEL (193) ont analysé les produits dissous. Par électrophorèse ils ont pu séparer trois fractions d'importance inégale, colorées en jaune. L'identification des acides aminés contenus dans chacune de ces fractions a été réalisée par chromatographie sur papier, après hydrolyse acide. Primitivement, ces auteurs avaient trouvé, dans le constituant principal, de l'alanine, de l'acide glutamique et de la cystine. Mais, suivant le conseil de WORK, ils ont refait cette analyse et constaté que le troisième acide n'était pas la cystine mais l'acide diaminopimélique (393). Ils ont d'ailleurs retrouvé dans cette fraction presque tout l'acide diaminopimélique de la paroi.

Ces résultats ont revêtu du même coup une importance considérable, quand on a remarqué que les acides aminés ainsi libérés sont précisément ceux de « l'élément fondamental de structure »

décrit par WORK (419) et d'autres auteurs. Il semble que le système enzymatique des coliphages attaque la paroi au même niveau que le lysozyme. WEIDEL et PRIMOSICH (392) ont d'ailleurs mis en évidence l'analogie entre le substrat de l'enzyme des coliphages et le glucopeptide manquant dans les parois des bactéries à Gram négatif cultivés en présence de pénicilline.

Les deux autres fractions obtenues ne sont libérées en quantité importante que s'il y a un grand nombre de phages absorbés (193). Elles contiennent beaucoup plus d'acides aminés. D'après KOCH et WEIDEL (193), il ne s'agirait probablement pas de constituants de la paroi obtenus par action spécifique des enzymes des phages, mais de produits secondaires de dégradation des parois fortement attaquées.

La technique de « marquage » de la paroi par le D.N.F.B. a également permis aux mêmes auteurs de montrer que l'enzyme des phages n'est pas spécifique du type, alors qu'il existe une relation spécifique étroite entre chaque type de phage et le site récepteur correspondant. Ainsi, les coliphages T_2 et T_4 , ont des sites récepteurs différents dans la paroi d'*Escherichia coli* B, bien que leur enzyme libère les mêmes fractions de la paroi (193). KOCH et WEIDEL (193) ont pu établir, par ailleurs, que le site récepteur d'un phage et le substrat de l'enzyme n'occupent pas la même place dans la paroi.

SITUATION DU SUBSTRAT ET DES SITES RÉCEPTEURS DANS LA PAROI.

En traitant les parois d'*Escherichia coli* B par une solution aqueuse de phénol à 90 %, on en dissout 80 % du poids sec. Le résidu insoluble représentant les 20 % restant, contient des quantités importantes de glucides et de lipides à côté d'un petit nombre d'acides aminés caractéristiques. Il semble constituer la charpente de la paroi, responsable de la rigidité; la fraction dissoute dans le phénol paraissant plastique et peu rigide (393) (*).

L'utilisation de phages comme indicateurs a permis de préciser les positions relatives de ces deux couches (393). Après enlèvement de la couche soluble dans le phénol, dite lipoprotéique, les parois n'absorbent plus les phages T_2 et T_6 , alors que l'absorption de T_4 est considérablement augmentée (393). Tout se passe comme si

(*) WEIDEL, KOCH et LOHSS (391), sur les données analytiques que nous discuterons à la fin de notre exposé, ont appelé « couche lipopolysaccharidique » la couche insoluble dans le phénol et « couche lipoprotéique » la couche soluble dans le phénol.

le site récepteur de T_4 , qui se trouve dans la fraction insoluble dans le phénol, dite couche lipopolysaccharidique, avait été démasqué par ce traitement. Or, comme dans les essais effectués, les phages ne peuvent agir qu'en partant de l'extérieur, il apparaît que la couche externe de la paroi est constituée par la fraction soluble dans le phénol, dite lipoprotéique et qu'elle contient les sites récepteurs de T_2 et T_6 . Elle masquerait, pour une grande partie, les sites de T_4 situés dans la couche insoluble dans le phénol, dite lipopolysaccharidique.

Cette dernière semble bien constituer le substrat de l'enzyme des phages. En effet, l'analyse chromatographique de la partie soluble dans le phénol montre que, si elle contient un grand nombre d'acides-amino, on n'y trouve cependant pas l'acide diaminopimélique. En revanche, la fraction lipopolysaccharidique en contient des quantités importantes, de l'acide glutamique et de l'alanine. On y trouve également de la glucosamine, du glycocolle, de la lysine et de l'acide muramique (393). WEIDEL et PRIMOSICH (393) font remarquer que cette fraction possède les constituants mêmes de la paroi des bactéries à Gram positif et ils n'hésitent pas à l'appeler, par analogie, « couche Gram-positive » (393).

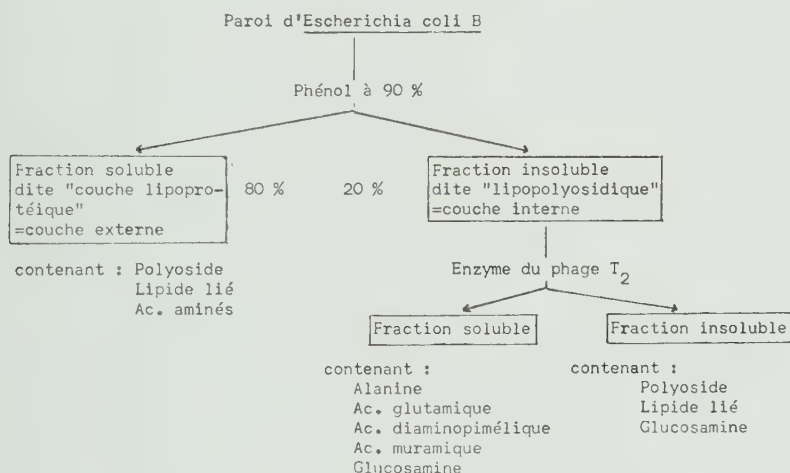
WEIDEL et PRIMOSICH (393) ont étudié en détail la structure de cette couche dite « Gram-positive ». Après l'avoir soumise à l'action de l'enzyme du coliphage T_2 , ils ont analysé les éléments solubilisés, ainsi que le résidu insoluble. Ils ont évité le risque de souiller les produits dissous par les éléments provenant de la dégradation de l'enveloppe des phages, en séparant l'enzyme actif de ces enveloppes (392, 393). Pour cela, les phages en suspension dans de l'eau furent soumis à des congélations successives suivies de décongélations. Les enveloppes se rompant, libèrent l'enzyme actif; on élimine l'insoluble par centrifugation.

Le surnageant ainsi obtenu peut dissoudre un tiers de la couche insoluble dans le phénol (393), laissant un résidu séparable par centrifugation. L'analyse chromatographique de la fraction dissoute montre qu'elle contient tous les acides aminés et les sucres aminés déjà identifiés dans la couche « Gram-positive », à savoir : l'acide diaminopimélique, l'acide glutamique, l'alanine, la glucosamine, l'acide muramique ainsi que des petites quantités de glycocolle et de lysine.

En revanche, le résidu après traitement par l'enzyme phagique ne contient que des traces de ces constituants, exception faite pour la glucosamine. Il est constitué principalement de lipides, de glucose, d'un heptose et d'un peu de glucosamine. On y retrouve le

site récepteur du coliphage T_4 intégralement conservé, ce qui confirme l'hypothèse que le substrat attaqué par l'enzyme est différent du site récepteur du phage (393).

La fraction dissoute par l'enzyme à partir de la couche insoluble dans le phénol, présente un pouvoir réducteur que ne possèdent ni le résidu non dissous par l'enzyme, ni la couche directement soluble dans le phénol. Il paraît vraisemblable que l'enzyme du phage hydrolyse une liaison glucosidique, peut-être à la manière du lysozyme (193, 393).



2. — LES ANTIGÈNES SOMATIQUES COMPLETS

Les constituants de nature polyosidique, lipidique ou protéique extraits des parois des bactéries à Gram négatif, se trouvent assemblés dans celles-ci en des molécules ou complexes plus volumineux, dont certains ont fait l'objet de nombreuses études. Les renseignements obtenus ont enrichi les connaissances sur la structure de la paroi ectoplasmique.

Les premières tentatives eurent pour but d'extraire des constituants possédant les caractéristiques biologiques de l'antigène somatique; ce n'est que beaucoup plus tardivement qu'on s'est intéressé aux autres constituants de la paroi ne présentant pas de caractère biologique manifeste mais qui jouent un rôle fondamental dans l'organisation pariétale.

Nous avons déjà rappelé que le premier, en 1933, BOIVIN (28), par action de l'acide trichloracétique, parvint à extraire des bacté-

ries l'antigène somatique et le considéra d'abord comme un complexe glucido-lipidique. On s'est aperçu, par la suite, qu'il contenait également un élément polypeptidique (31). L'élément glucidique représente généralement plus de 50 % et souvent plus de 60 % de l'antigène. L'élément lipidique représente de l'ordre de 10 à 20 %, mais peut, selon les bactéries, s'abaisser à quelques unités %, ou s'élever à 30 % (31).

Dès 1934, RAISTRICK et TOPLEY (292) firent connaître une méthode à la trypsine qui conduit à des complexes spécifiques, antigéniques et toxiques, plus riches en azote que ceux fournis par l'acide trichloracétique. FREEMAN et coll., de 1940 à 1943, ont démontré la nature glucido-lipido-polypeptidique de ces préparations; l'élément polypeptidique étant plus abondant et l'élément phospholipidique moins abondant que dans les complexes préparés par l'acide trichloracétique (113 à 116).

En 1937, MORGAN (247), a mis au point une nouvelle méthode de préparation des antigènes somatiques, basée sur une extraction par le diéthylène — glycol anhydre. Dans des travaux ultérieurs, effectués en collaboration avec PARTRIDGE, il a prouvé que ces antigènes ont une structure glucido-lipido-polypeptidique (248, 249, 250).

Un autre principe général d'extraction, facile à mettre en œuvre, a été décrit par PALMER et GERLOUGH en 1940 (269). Il consiste en un traitement des bactéries par du phénol à 80-95 %, suivi d'un épuisement par l'eau. Cette méthode donne également un lipopolyoside très toxique et fortement antigénique. WESTPHAL et coll. (398) ont simplifié le procédé, en traitant les bactéries, à froid, avec des émulsions de phénol dans de l'eau. Ils ont ainsi obtenu les mêmes produits que PALMER et GERLOUGH.

D'autres méthodes mettant en œuvre une solution d'urée (384), un mélange pyridine-eau (11, 126) ou une simple extraction à l'eau chaude (300), ont été proposées pour isoler des antigènes O complets à partir des bactéries à Gram négatif: on obtient toujours des complexes glucido-lipido-polypeptidiques.

Propriétés physiques de l'antigène somatique.

Les divers complexes antigéniques obtenus à partir des bactéries à Gram négatif par les procédés que nous venons de citer, présentent de grandes analogies de propriétés physiques, de structure et de propriétés biologiques. Toutes ces propriétés peuvent être ramenées à celles de l'ensemble que constituent le lipide B et le

complexe glucido-lipido-polypeptidique, obtenu par extraction au diéthylène glycol, suivant la technique de MORGAN (247).

Ce complexe se dissout dans l'eau en donnant des solutions opalescentes, plus ou moins visqueuses. Pour des pH compris entre 8 et 9, il migre lentement et se comporte comme un anion, ce qui s'explique par le fait qu'il contient des esters phosphoriques (403). Certaines des préparations de complexes analogues migrent d'une façon homogène à l'électrophorèse (128, 170, 331, 337). Leur poids moléculaire, déterminé par ultracentrifugation d'une solution aqueuse, a une valeur qui varie de 1.000 (78, 337) à 20.000 (331). SCHRAM, WESTPHAL et LÜDERITZ (331) ont pu montrer, à l'aide du microscope électronique, que les grandes particules obtenues sont, en réalité, constituées par des agrégats de particules élémentaires, dont le poids moléculaire est de l'ordre de 1.000. Ces particules élémentaires ont une forme sphérique et, suivant le pH, s'agglomèrent, d'une manière réversible, en longues chaînes. Ceci expliquerait pourquoi ces substances ne se comportent pas d'une façon homogène à l'ultracentrifugation.

Structure de l'antigène somatique.

On peut extraire de toutes les formes « smooth » des bactéries à Gram négatif étudiées jusqu'à présent des ensembles lipide B-complexe glucido-lipido-polypeptidique (247, 248, 249, 250) dont l'architecture est très voisine (403). La structure de tels antigènes obtenus à partir d'*Escherichia coli* et de diverses *Salmonella*, a été particulièrement étudiée par WESTPHAL et coll. (214, 399, 403, 406) qui en ont séparé les divers groupes de constituants.

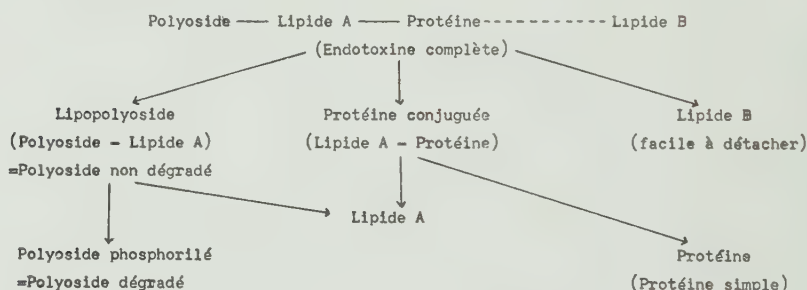
Le lipide B, très faiblement lié aux constituants antigéniques, se détache facilement. Il semble occuper une place superficielle et, d'après WESTPHAL (408), il serait simplement adsorbé sur la surface de l'antigène complet dont il ne ferait pas partie intégrante.

En revanche, les liaisons reliant le lipide A à la fraction polysidique d'une part, et à la fraction protéique d'autre part, sont beaucoup plus solides. Le lipide A serait lié à la partie polypeptidique par l'intermédiaire d'un acide aminé dicarboxylique, l'acide aspartique, qui en fait partie intégrante (403). Cette liaison n'est rompue qu'en traitant plusieurs fois l'endotoxine complète par un mélange phénol-eau, ou en effectuant une hydrolyse par un alcali en solution alcoolique. Ceci explique pourquoi les méthodes de MORGAN (248, 249, 250), GOEBEL (24) et WESTPHAL (398) conduisent à un antigène contenant très peu d'acides aminés : on obtient un lipopolyoside auquel on a donné le nom de polysaccharide non

dégradé (248, 249). Le clivage s'effectue entre l'acide aminé dicarboxylique et le reste de la fraction protéique; on retrouve, en effet, l'acide aspartique dans les produits d'hydrolyse du lipide A purifié (403, 404).

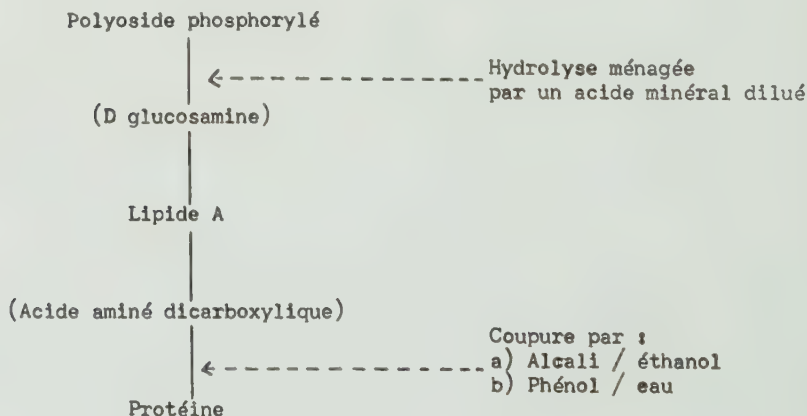
La liaison entre le lipide A et le polyoside spécifique de l'antigène O se fait par l'intermédiaire de la glucosamine (403, 404). Une hydrolyse ménagée par un acide minéral dilué sépare le polyoside du lipide A, la glucosamine restant liée à ce dernier (403, 404). Ce polyoside pur, obtenu par hydrolyse, a reçu le nom de polysaccharide dégradé (248, 249).

Les diverses méthodes de fractionnement de l'endotoxine complète peuvent donc conduire à la libération de plusieurs produits de clivage qui sont les constituants de l'antigène somatique :



Les constituants des endotoxines O des bactéries à Gram négatif
(d'après WESTPHAL et LÜDERITZ [403]).

Il est possible de schématiser les liaisons des différents constituants de la manière suivante (WESTPHAL et LÜDERITZ (409)) :



Propriétés biologiques de l'antigène O complet et du complexe glucido-lipidique.

Les complexes glucido-lipido-protéiques extraits des bactéries à Gram négatif sont des antigènes puissants et portent la spécificité O (127, 239, 247, 250, 252, 275), cette spécificité étant liée à la fraction polysidique (31). La fraction protéique favorise l'antigénicité, mais n'intervient pas dans la spécificité (403). Pour le moment, on ne sait rien des propriétés biologiques du lipide B. En revanche, nous avons vu que celles du lipide A présentent une grande importance.

Les lipopolyosides exempts de protéine sont également fortement antigéniques pour le lapin (127, 248, 249, 275). Il suffit, en effet, de quelques injections à la dose de 0,01 µg/kilo pour faire apparaître des anticorps capables d'agglutiner les germes correspondants (300, 399). D'autre part, les antisérums préparés par injection de germes complets précipitent le lipopolyoside homologue d'une façon spécifique (403).

Les propriétés endotoxiques des lipopolyosides sont les mêmes que celles des antigènes O complets correspondants (24, 382, 383, 399). La dose léthale moyenne pour la souris, le cobaye et le lapin est de 0,5 à 10 µg/kilo, par voie parentérale (403). La plupart d'entre eux produisent le phénomène de SANARELLI-SCHWARTZMAN (403) (*). GRATIA et LINZ (133) ont montré, d'autre part, qu'une seule injection de ces substances pouvait provoquer la nécrose du tissu tumoral, chez les animaux déjà porteurs de tumeurs. En revanche, ils ne donnent pas le phénomène de SCHULTZ-DALE (**) (230).

La plupart des lipopolyosides extraits des bactéries à Gram négatif se sont montrés très irritants pour l'homme et les animaux supérieurs. Ils sont fortement pyrogènes, propriété utilisée depuis longtemps à des fins thérapeutiques. Une injection intraveineuse de 0,1 à 1 µg/kilo provoque une augmentation de température variant de 2 à 3°C (399) et s'accompagne de modifications sanguines; on

(*) Pour produire ce phénomène, on prépare les animaux réceptifs par une injection « sensibilisante » (voie sous-cutanée) qu'on fait suivre, après 24 heures, d'une deuxième injection « déchainante » (voie intraveineuse). On obtient alors une *nécrose hémorragique* à l'endroit de la première injection.

(**) « SCHULTZ (1909) et DALE (1912) ont montré que certains organes lisses (intestin, corne utérine) d'un cobaye préalablement sensibilisé, excisés et maintenus en survie en dehors de l'organisme, dans une solution de RINGER, réagissent par une contracture violente et durable à l'addition de l'antigène » (139).

observe une très forte leucopénie avec lymphopénie, suivie d'une leucocytose (399).

C'est à la présence de lipide A qu'ils doivent leurs propriétés de favoriser la production de properdine et de stimuler la résistance non spécifique aux infections (118. 405). Ils lui doivent également leur propriété fibrinolytique (118. 405). Cependant, les lipopolyosides provenant des bactéries à Gram négatif, possèdent un certain nombre de propriétés pharmacologiques qui leur sont propres. Elles ont été étudiées particulièrement par MEIER et coll. (230). *In vitro*, ils exercent un chimiotactisme sur les leucocytes et semblent activer la phagocytose (230). Ils possèdent, en outre, une activité antianaphylactique très nette et peuvent inhiber le phénomène d'ARTHUS (*). Ils interviendraient également dans certains phénomènes du métabolisme. Des expériences effectuées par MEIER et coll. montrent, en effet, que ces substances activent l'élimination du sodium, diminuent la lipémie et stimulent fortement la croissance (230). Ces auteurs ont d'ailleurs remarqué que des lipopolyosides marqués au C^{14} se fixaient au niveau des surrénales (230).

On ne connaît pas le mécanisme exact de tous ces phénomènes. Il semble que dans certains cas les lipopolyosides agiraient directement, alors que, dans d'autres cas, ils feraient intervenir des mécanismes secondaires (230).

3. — LES CONSTITUANTS AUTRES QUE LES ANTIGÈNES SOMATIQUES

Le complexe glucido-lipido-protéique constituant l'antigène somatique complet, n'est qu'un des éléments de la structure des parois des bactéries à Gram négatif. En effet, aucun des procédés d'extraction de l'antigène somatique ne permet d'obtenir une dissolution intégrale de la paroi. Ainsi, le traitement par le diéthylène-glycol ou par le phénol laisse toujours un résidu insoluble qu'on peut séparer par centrifugation. Le culot obtenu contient des élé-

(*) Des injections sous-cutanées répétées d'un antigène, à un lapin ou un cobaye, provoquent la formation d'une escarre saignante dans la région injectée. Le même phénomène peut se produire si l'on injecte un immun sérum par voie veineuse et l'antigène correspondant par voie dermique. Cette réaction de sensibilisation, qui est active dans le premier cas et passive dans le second, a reçu le nom de « phénomène d'Arthus » et doit être considérée comme une réaction tissulaire provoquée par la précipitation du complexe antigène-anticorps.

ments transparents qui conservent encore la forme de la paroi. On est donc conduit à admettre ou bien que les méthodes employées ne permettent qu'une extraction partielle des éléments constitutifs, ou bien que d'autres constituants sont responsables des structures résiduelles qui conservent, ce point est à noter, la forme générale de la bactérie. Les travaux, que nous avons cités, de WEIDEL et coll. sont en faveur de cette seconde hypothèse. Ces auteurs ont, en effet, montré que la fraction insoluble dans le phénol est de nature lipopolyosidique et que sa constitution est différente de celle de l'antigène O complet. Ses constituants chimiques ont été cependant peu étudiés, peut-être parce qu'elle ne représente que 20 % du poids total de la paroi (393). Cette fraction insoluble contient un glycopeptide constitué généralement de glucosamine, d'acide muramique, d'acide diaminopimélique, d'acide glutamique et d'alanine, et qui formerait la charpente de la paroi (419). On y trouve, également, une fraction polyosidique constituée, semble-t-il, de glucose et d'un heptose non identifié (391, 393), et aussi un lipide lié, dont on ne sait pas encore s'il est de même nature que le lipide A de l'antigène somatique. On ne connaît pas davantage la nature des liens qui rattachent ce lipide aux autres constituants.

Il est intéressant de remarquer que JESAITIS et GOEBEL (128, 170) avaient déjà constaté que la fraction de la paroi de *Shigella sonnei* insoluble dans le phénol est de composition identique à celle de la fraction correspondante obtenue à partir d'*Escherichia coli*. Elle possède également des propriétés réceptrices vis-à-vis des phages T₃, T₄ et T₇. Ceci semble montrer que les fractions lipopolyosidiques contenues dans les parois des diverses bactéries à Gram négatif, et insolubles dans le phénol, ont une constitution identique, tout au moins partiellement. On peut supposer qu'elles possèdent une spécificité antigénique, quoique l'étude des anticorps correspondants n'ait pas encore été entreprise.

4. — DONNÉES ACQUISES PAR LES PROCÉDÉS PHYSIQUES D'INVESTIGATION

a) Microscopie électronique.

Depuis 1949, où BAKER et PEASE (12) publiaient les premières images, prises au microscope électronique, de coupes ultra-fines de bactéries, on n'a pas cessé d'appliquer cette technique à l'étude de l'anatomie bactérienne. Cependant, si paradoxal que cela puisse paraître, peu d'auteurs se sont intéressés à l'étude, au microscope électronique, de la paroi ectoplasmique.

En 1953, HOUWINK (159), à l'aide du procédé classique d'ombrage par projection de vapeurs métalliques, mettait en évidence, dans la paroi d'une spirille, la présence d'éléments sphériques ayant de 120 à 140 angströms de diamètre. La même observation a été réalisée depuis, par SALTON et WILLIAMS (316, 320), chez *Rhodospirillum rubrum*, et, par LABAW et MOSLEY (199), chez un bacille non identifié. Cependant, en dehors de ces trois cas, on n'a jamais pu mettre morphologiquement en évidence l'existence de constituants élémentaires dans les nombreuses parois observées.

D'après une série de documents photographiques réalisés par CHAPMAN (49), la paroi ectoplasmique peut apparaître sous deux aspects différents : ou bien elle se présente avec une densité uniforme sur toute son épaisseur, ou bien elle semble constituée par deux lignes denses séparées par un intervalle moins dense. KELLENBERGER et RYTER (186) avaient déjà noté ce fait dans le cas d'*Escherichia coli*. Ils admettent que la zone de faible densité serait constituée par un polyoside (absorbant faiblement les électrons), tandis que les couches de forte densité seraient de nature protéique ou lipoprotéique (absorbant fortement les électrons) (186) : mais ils font ressortir qu'il faudrait vérifier cette hypothèse sur des parois isolées.

L'existence d'une couche polyosidique au centre de la paroi nous paraît peu vraisemblable : la plupart des auteurs s'accordent à situer le polyoside spécifique (seule fraction polyosidique importante de la paroi) sur la surface externe. D'ailleurs, CHAMPAN (49) n'écarte pas l'hypothèse selon laquelle l'aspect stratifié, observé dans certains cas, traduirait l'accumulation, sur les deux faces de la paroi, d'une substance très opaque aux électrons (peut-être de l'osmium réduit). Il pense également que les deux couches opaques pourraient encore correspondre à une plus grande concentration des molécules du matériel pariétal, ou à un arrangement différent et plus compact de ces molécules.

L'étude, au microscope électronique, des coupes ultra-fines de bactéries, a permis de mesurer directement l'épaisseur de la paroi ectoplasmique. Celle-ci varie considérablement suivant l'espèce observée. Elle peut être inférieur à 100 angströms ou s'élever jusqu'à 600 angströms (49). Elle se situe généralement entre 150 et 200 angströms.

DE et SADHUKHAN (87) ont décrit une variante pour la détermination de l'épaisseur des parois, basée sur la densitométrie des photographies de parois isolées, obtenues au microscope électronique. Ils ont ainsi établi que l'épaisseur de la paroi d'*Escherichia*

coli était de 186 angströms, alors que les chiffres avancés par d'autres auteurs (291, 309) varient entre 100 et 150 angströms.

b) Diffraction des Rayons X.

D'après HURST (163), l'épaisseur trop grande des parois ectoplasmiques rend celles-ci impropres aux études par diffraction des rayons X. Pourtant, GROSSBARD et PRESTON (134, 135), ont pu appliquer cette méthode à des parois préalablement isolées et desséchées, ou, directement, à des bactéries intactes. Dans le cas d'*Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*, ils ont pu mettre en évidence l'existence de trois anneaux principaux de diffraction. Le premier, large et diffus, traduit un enchaînement de molécules non orientées avec des intervalles de 4,4 à 4,6 angströms, variables suivant les bactéries. Cet anneau correspondrait à des protéines, sans cependant que soit écartée la possibilité d'inclusion d'autres substances. Les deux autres anneaux correspondant respectivement à des intervalles de 3,8-3,9 angströms et 4,2 angströms, sont dus, vraisemblablement, à des lipides, étant donné que ceux-ci possèdent, fréquemment, des plans moléculaires séparés par des intervalles de 3,73 à 4,13 angströms. Ces anneaux qui correspondraient à des lipides, sont toujours plus marqués dans le cas des bactéries à Gram négatif que dans celui des bactéries à Gram positif, ce qui concorde avec les résultats de l'analyse chimique, selon lesquels la teneur en lipides est beaucoup plus forte dans les bactéries à Gram négatif (320).

Afin de déterminer l'orientation des lipides, GROSSBARD et PRESTON (134, 135) ont utilisé un faisceau de rayons X parallèle à la surface longitudinale des bactéries comprimées entre deux plaques de verre. Ils ont ainsi établi que, dans le cas d'*Escherichia coli*, les plans moléculaires des espaces lipidiques s'étendent parallèlement aux chaînes hydrocarbonées, ce qui implique que ces chaînes sont perpendiculaires à la surface des bactéries. D'ailleurs, ces régions pseudo-cristallines ont au moins 200 angströms de large, chiffre supérieur à l'épaisseur de la paroi. Ceci confirme l'idée de l'existence de chaînes lipidiques normales à la surface, idée déjà émise par HURST (163). après une étude par diffraction des électrons. PRESTON et GROSSBARD (134, 135) pensent que les lipides formeraient une ou plusieurs lamelles enveloppant complètement la partie interne de la bactérie. Cependant, ils ne se hasardent pas à situer ces lamelles lipidiques dans la paroi et ils se contentent de signaler que des mesures de potentiel zêta, effectuées par DAVIES et coll. (84) sur *Escherichia coli*, semblent indiquer que la surface externe de cette bactérie est de nature polyosidique.

CHAPITRE IV

LA CAPSULE

D'une manière habituelle, les bactériologistes donnent le nom de *capsule* à une enveloppe bactérienne située à l'extérieur de la paroi ectoplasmique, visible au microscope ordinaire et dont la limite externe peut être précisée. Les rapports de cette entité cyto-logique avec la paroi apparaissent très étroits et il est souvent difficile de distinguer ce qui appartient en propre à celle-ci de ce qui fait partie de la capsule. Dans une revue d'ensemble, WILKINSON (410) note que la distinction entre paroi et capsule est fondée sur les caractères suivants :

a) L'épaisseur : la paroi est une enveloppe mince dont l'épaisseur est habituellement comprise entre 10 et 20 μ et n'excède pas 25 μ , c'est-à-dire qu'elle n'est visible qu'au microscope électronique. En revanche, la capsule est, par définition, parfaitement visible au microscope ordinaire, ce qui revient à dire que son épaisseur est, au moins, de 200 μ ;

b) La fonction : la paroi est un organite indispensable à la viabilité bactérienne; si elle est détruite sans que le protoplasme soit altéré, la cellule se révèle, en général, incapable de se diviser. Il n'en est rien quand on élimine la capsule des bactéries (95) ;

c) La composition : la paroi est composée de constituants de très haut poids moléculaire, habituellement de nature glucido-lipido-protéique. Ceux-ci forment un ensemble structural relativement peu hydraté, difficile à rompre en constituants élémentaires. La capsule, au contraire, est habituellement constituée de molé-

cules beaucoup plus simples, polyosodiques ou protéiques, et contient de l'ordre de 98 % d'eau, ce qui la rend de consistance visqueuse ou gélatineuse.

Ces données précises ne permettent pas d'éviter certaines difficultés. Tout d'abord, la fixation de l'épaisseur minimum d'une capsule à 200 m μ (visibilité au microscope ordinaire) est artificielle et on a été amené à parler de microcapsules pour décrire des formations de moindre épaisseur, ordinairement décelables au microscope électronique (bien que cela pose des problèmes techniques de préparation très difficiles à résoudre), et dont l'existence ne paraît pas essentielle à la cohésion mécanique et osmotique de la bactérie, ni à sa viabilité. Ces microcapsules peuvent être observées chez des espèces habituellement capsulées, mais placées dans des conditions de culture peu favorables à la production de capsules. Ainsi, les antigènes d'enveloppe L et B des *Escherichiae* constituent des microcapsules, alors que l'antigène A constitue une véritable capsule (268).

Il est remarquable en effet, que les conditions de culture les meilleures pour la formation de la capsule, ne sont pas, habituellement, les conditions optimales du développement bactérien. Ainsi, dans le cas de *Klebsiella aerogenes*, DUGUID et WILKINSON (100) ont constaté, en étudiant les effets de la carence partielle des éléments nutritifs sur la production de la capsule, que, si le facteur limitant est constitué par les éléments carbonés, notamment les glucides, on observe une production minimum de polyosides, sur les milieux solides. Si, en revanche, on diminue graduellement la teneur en azote, on observe que la quantité de polyosides extracellulaires produite par les bactéries monte jusqu'à une valeur maximale. Quand les facteurs limitants sont les sources de soufre et de phosphore, on obtient des résultats analogues. Dans tous les cas, la production de polyosides, appréciée par le rapport glucides azote total, atteint un maximum. Bien qu'on ne connaisse pas avec certitude la raison de ce phénomène, tout se passe comme si, lorsque la source de carbone est suffisante, et déficiente la source en azote, soufre ou phosphore, la synthèse des polyosides continuait à se faire; alors que celle des autres éléments constitutifs de la paroi, en particulier les lipides et les protéines, se trouverait ralentie. On conçoit alors, que cet excès de polyosides libres se trouve rejeté, éventuellement, à l'extérieur, constituant ainsi un antigène d'enveloppe, une microcapsule ou une capsule.

C'est dans ce cadre que nous situons volontiers les observations de DAVIES et coll. (79). Ces auteurs ont préparé, à partir du surna-

geant du milieu de culture où s'était développé *Shigella dysenteriae*, un polyoside, qualifié de « non dégradé », ne contenant pas de lipides. Cette substance de poids moléculaire très élevé, possède la spécificité immunologique du polyoside de la souche. Il est certain qu'un tel produit ne peut pas provenir de la décomposition de l'endotoxine complète, car le poids moléculaire du polyoside ainsi obtenu serait beaucoup plus faible (de l'ordre de 20.000). D'après DAVIES lui-même (79) :

« Le polyoside non dégradé, provenant de l'endotoxine, serait analogue au polyoside extracellulaire. Chez *Aerobacter aerogenes*, par exemple, le polyoside extracellulaire a la même composition en glucides et la même spécificité que le polyoside entrant dans la composition de l'antigène complet. »

Il admet qu'on pourrait se trouver en présence d'une production en excès de polyoside, lequel serait libéré dans le milieu de culture sans avoir contracté de liaison avec les autres composants de l'antigène somatique.

Il nous paraît possible de rapprocher de la formation, par les souches d'entérobactéries, de ces polyosides extracellulaires, celle de l'antigène Vi. On admet, en effet, que l'antigène Vi est un antigène de surface que WILSON et MILES (412) rapprochent des antigènes K décrits par KAUFFMAN (185) chez les coliformes, quoique FÉLIX (107) se soit opposé à cette façon de voir. Tout comme les antigènes Vi, les antigènes K constituent un groupe d'antigènes somatiques labiles vis-à-vis d'agents tels que la chaleur, l'acidité, l'alcalinité, l'alcool; ce degré variant, d'ailleurs, suivant les conditions dans lesquelles est mené le traitement. L'extraction de l'antigène Vi, à partir des corps bactériens, montre, d'autre part, que la fraction polyosidique responsable de sa spécificité antigénique fait partie d'un complexe glucido-lipido-protéique de même type que l'antigène somatique O complet. Cependant, la preuve ne paraît pas absolument faite que ce soit exclusivement sous cette forme que l'antigène Vi passe en solution dans le milieu de culture ou dans les solutions salines. L'antigène Vi, extrait par WEBSTER, LANDY et FREMAN (388), en traitant les corps bactériens d'une souche d'*Escherichia coli*, à l'état sec, par une solution de chlorure de sodium à 0,9 %, ne contient pas de lipides. En purifiant le produit obtenu, par la méthode de SEVAG qui permet d'éliminer les protéines associées sans risque d'hydrolyse, on obtient un polyoside. Il semble bien, d'autre part, qu'il existe une corrélation entre l'existence d'une microcapsule et celle de la formation de l'antigène Vi, bien que FÉLIX (107) ne soit pas de cette opinion. Dès 1938, BHATNAGAR et coll. (23), ont montré, qu'après coloration par l'encre de chine des frottis d'une souche riche en antigène Vi, on

pouvait distinguer autour des bacilles un espace clair, non coloré, ayant l'aspect d'une enveloppe gélatineuse. En recherchant la capsule chez un grand nombre de souches Vi, après mordantage par le chlorure ferrique, SHIMOJO (338) a constaté que si toutes les souches capsulées ne possèdent pas d'antigène Vi, en revanche, toutes celles qui possèdent cet antigène ont également une capsule, lorsqu'elles sont en forme V. Les formes W correspondantes n'ont pas de capsule. Quand aux formes VW, elles représentent un mélange de bactéries capsulées et de bactéries non capsulées; l'agglutination par l'anticorps Vi étant parallèle au nombre des premières. Ceci confirme les observations de ANDO et NAKAMURA (6), promoteurs de la méthode de coloration des capsules par mordantage au chlorure ferrique. Plus récemment, la microscopie électronique a permis d'observer qu'*Eberthella typhi* Vi V présente une enveloppe superficielle qui paraît être essentiellement liée à l'antigène Vi, et qui précipite sous forme de filaments quand elle est traitée par une solution de chlorure ferrique à 0,1 %. Elle disparaît également des bactéries lorsqu'on leur fait subir un chauffage ménagé. Cette enveloppe n'existe pas dans les formes W (420).

Les rapports étroits qui existent entre la paroi et la capsule avaient, dès 1945, conduit DUBOS (97) à donner de celle-ci, une représentation dynamique. Cette formation constituerait, en somme, la région enveloppant la bactérie où s'accumulent des produits de sécrétion de haut poids moléculaire. L'épaisseur de cette enveloppe dépendrait de l'équilibre entre la sécrétion d'une part, et la diffusion dans le milieu d'autre part. L'épaisseur apparente de la capsule varie suivant le procédé d'observation utilisé. Il est parfaitement prouvé, aujourd'hui, que le phénomène de « gonflement de la capsule » chez les pneumocoques, obtenu par l'usage d'un immun-sérum spécifique, ne correspond nullement à l'augmentation de l'épaisseur de cette capsule; mais bien à la limitation plus lointaine de la zone de diffusion, du fait de la formation d'un précipité antigène-anticorps périphérique.

L'usage des protéines pour mettre en évidence les capsules directement invisibles, constitue une méthode générale. TOMCSIK et GUERX-HOLZER (374, 377) ont montré que celles-ci deviennent visibles au microscope à contraste de phase quand, en présence des protéines les plus diverses, on se place dans une zone de pH convenable, zone habituellement étroite où la bactérie et la protéine présentent des charges électriques opposées. Ce phénomène est manifestement dû à la formation de complexes, par mise en jeu

de forces électrostatiques, entre les polyosides capsulaires et la protéine. C'est un phénomène réversible, qui disparaît lorsqu'on modifie le pH ou si on opère en présence d'une concentration saline suffisante (374, 377). Il ne s'agit, en aucun cas, d'une réaction de « gonflement »; mais d'une mise en évidence, à une distance plus ou moins grande de la paroi, de l'existence de produits extracellulaires très hydratés et qui ont tendance à se dissoudre dans le milieu. COLOBERT a interprété par ce mécanisme, le phénomène de « gonflement » de la paroi provoqué par le lysozyme et d'autres protéines basiques sur des bactéries non directement lysables (57).

Il résulte donc de cet exposé que la capsule est une formation étrangère à la paroi ectoplasmique.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

INTRODUCTION

Des travaux préliminaires, d'ordre immunologique, tendaient à faire penser que le substrat du lysozyme, dans la paroi des salmonelles, n'était autre que l'antigène somatique (55, 58, 59, 60, 64). On pouvait tenter d'extraire cette substance par des procédés déjà connus et de vérifier chimiquement que celle-ci se trouvait bien hydrolysée par le lysozyme. Cette manière de faire avait pour elle la facilité; mais le succès n'était assuré que dans la mesure où l'interprétation délicate des travaux préliminaires était exacte. De plus, cette méthode présentait l'inconvénient de limiter les investigations aux fractions solubles des parois, car tous les procédés destinés à préparer l'antigène somatique laissent subsister une texture insoluble qui conserve la forme et la rigidité de la paroi intacte.

Un autre procédé consistait à fractionner progressivement les bactéries, en ayant soin de conserver au mieux les textures naturelles, à situer les constituants qui se trouveraient être hydrolysables par lysozyme, puis à les isoler et à les purifier. C'est cette méthode que nous avons suivie. Elle a le mérite de pouvoir, éventuellement, faciliter l'identification et la localisation du substrat du lysozyme parmi les autres constituants de la paroi.

Dès lors, il convenait, tout d'abord, de préparer les parois bactériennes de manière conservatrice et de vérifier que le substrat du lysozyme s'y trouvait contenu, puis de dissoudre ces parois par un procédé doux permettant de dissocier la texture sans dénaturer les éléments constitutifs, enfin de localiser et d'isoler parmi ces derniers le substrat de l'enzyme. Ce but a été atteint en utilisant au départ un enzyme de spécificité connue agissant à un pH voisin de la neutralité, puis un corps tensioactif dissociant la structure pariétale par voie physique, enfin un sel de baryum formant des complexes insolubles avec certains constituants. La seule opération dont l'effet ne peut être précisé, est le chauffage ménagé des bacté-

ries, qui constitue le temps préparatoire, et malheureusement obligatoire, à la digestion par la trypsine. Mais, il faut noter que si ce traitement peut être jugé suffisant pour dénaturer certaines macromolécules en modifiant leur structure secondaire ou tertiaire, il est peu probable qu'il soit suffisant pour rompre des liaisons de covalence. Il paraît donc *a priori* vraisemblable que les fractions chimiques isolées par la suite, constituent bien des entités naturelles préexistant dans la paroi et qu'on soit en droit de chercher à définir leur composition, leur rôle et leur situation. En tout état de cause, il résulte de l'étude bibliographique, qu'il n'existe aucun procédé de préparation des parois qui ne soit exempt de grands inconvénients. Seuls les résultats, dans la mesure où ils éclairent et complètent les connaissances déjà acquises, permettent de juger *a posteriori* de la valeur du procédé; il y a certes là une véritable pétition de principe, mais il n'est pas possible, pour l'instant, de l'éviter.

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUES ANALYTIQUES

1. — LES MÉTHODES DE DOSAGE

Les parois des bactéries à Gram négatif contiennent des constituants glucidiques, des constituants lipidiques et des constituants protéiques, libres ou liés entre eux dans des molécules complexes. Les dosages de chacun de ces constituants posent de difficiles problèmes techniques qui ne sont jamais résolus de manière parfaitement satisfaisante. Comme les techniques auxquelles nous avons fait appel sont classiques, ou n'ont pas subi de modifications originales de notre part, nous nous contenterons simplement de rappeler leur principe sans entrer dans les détails opératoires; mais il nous paraît nécessaire de discuter plus longuement de leur valeur.

Dosage des glucides réducteurs totaux.

Ce dosage est toujours entaché d'une certaine erreur par défaut et il perd toute valeur si on ne s'entoure pas de précautions particulières, surtout dans le cas des polyosides et des glycoprotéines, où il est nécessaire de procéder à une hydrolyse acide préalable. Celle-ci possède de sérieux inconvénients qui ont été résumés par RIMINGTON (298) de la manière suivante :

1° Si la période de chauffage est trop courte ou la température insuffisamment élevée, l'hydrolyse peut être incomplète et, en conséquence, la valeur réductrice trouvée, trop basse;

2° L'ébullition d'un glucide, même pur, en solution acide, entraîne une certaine destruction qui varie avec le glucide et l'acide utilisé, ainsi qu'avec la concentration de l'acide, la température et la durée du chauffage;

3° En milieu fortement acide, à chaud et en présence de certains acides aminés (en particulier, le tryptophane), ou des produits de dégradation des protéides, les glucides se condensent facilement avec ces corps azotés, ou ceux qui en dérivent, pour donner une substance noirâtre, amorphe, non réductrice, appelée *humine* (*).

Il n'est donc pas étonnant que de très grandes différences apparaissent, selon les auteurs, quant au temps d'hydrolyse, à la nature et à la force de l'acide employé.

Comme il n'existe pas de technique d'hydrolyse type, valable pour toutes les glycoprotéines, nous avons recherché, pour chacune des fractions étudiées, les conditions d'obtention d'un pouvoir réducteur maximal. Nous avons adopté, de manière systématique, l'hydrolyse chlorhydrique, des études récentes (237, 245) ayant montré sa supériorité sur l'hydrolyse sulfurique pour l'étude des glycoprotéines. Tous nos essais ont été réalisés en ampoules de verre Pyrex scellées, à + 100°C, au bain-marie, sur des concentrations en produit voisines de 0,1 %, ces faibles concentrations étant indispensables pour éviter la formation de l'humine.

Dans le cas des parois ectoplasmiques isolées, nous avons obtenu le taux maximal de substances réductrices après une hydrolyse de 8 heures à + 100°C dans l'acide chlorhydrique 0,5 N, conditions qui avaient déjà été adoptées par DAVIES et coll. (81) pour l'étude du polyoside spécifique de *Shigella dysenteriae*. Pour l'hydrolyse de l'antigène somatique et du substrat du lysozyme, nous avons obtenu des résultats sensiblement identiques en opérant dans les mêmes conditions, ou en utilisant l'acide chlorhydrique 2 N à + 100°C pendant 4 heures.

Nous avons vérifié que ce mode opératoire libérait peu d'hexosamines. D'après MONTREUIL et SCHEPPLER (245), les oses ne sont pas détruits dans ces conditions, à l'exception du fructose qu'on n'a d'ailleurs jamais identifié dans la paroi ectoplasmique des bactéries.

(*) « *Humine* est le nom donné à la substance azotée, insoluble, de couleur noire, qui se forme au cours de l'hydrolyse des protéines par les acides. Sa composition est inconnue, mais, apparemment, elle se forme principalement à partir du tryptophane. » (MIALL S. and MIALL L.M., *A New Dictionary of Chemistry*, Longmans, London, 1949).

Les oses libérés par l'hydrolyse, ont été habituellement dosés par leur pouvoir réducteur, selon la méthode de SOMOGYI (343), en suivant le mode opératoire décrit par Mlle STAUB (348). Le réactif de SOMOGYI est une solution alcaline tartrique de sulfate cuivrique, contenant de l'iodure de potassium et une quantité titrée d'iodate de potassium. L'ion cuivrique est réduit par les oses. Après acidification, l'oxyde cuivreux formé est oxydé par l'iode naissant et on titre l'excès d'iode par une solution 0,005 N d'hyposulfite de sodium.

Il existe deux réactifs différents, le premier servant pour les quantités de glucides comprises entre 20 et 500 μg , le second pour les quantités comprises entre 500 et 1.500 μg . Pour chaque préparation de ces réactifs, nous avons établi une courbe de correspondance entre les quantités d'hyposulfite 0,005 N et de glucides, au moyen d'une solution étalon de glucose.

Les dosages ont été effectués directement sur des parties aliquotes de l'hydrolysate chlorhydrique, après neutralisation par une solution de soude, et en titrant de la même façon des tubes témoins contenant les mêmes quantités d'acide chlorhydrique et de soude.

La méthode de SOMOGYI est facile à mettre en œuvre et se prête bien aux dosages en série. L'erreur de lecture ne dépasse pas 0,04 cm^3 d'hyposulfite 0,005 N, ce qui correspond à environ 10 μg de glucose. La principale cause d'erreur se trouve dans le fait que les résultats sont finalement exprimés en glucose, alors qu'on dose effectivement un mélange de glucides dont le pouvoir réducteur varie de l'un à l'autre.

Dosage colorimétrique des oses.

La méthode précédente présente des inconvénients majeurs; elle exige une hydrolyse préalable, jamais parfaitement satisfaisante; elle dose, éventuellement, les substances réductrices non glucidiques. C'est pourquoi, nous avons dosé parallèlement les oses totaux par des méthodes colorimétriques spécifiques qui ne nécessitent pas d'hydrolyse préalable.

Parmi les nombreuses techniques utilisées actuellement (8, 90, 348), nous avons adopté la méthode à l'orcinol et celle à l'anthrone qui nous ont toujours donné satisfaction, et dont l'usage s'est révélé très facile. Ces méthodes ont pour base le fait que les oses, chauffés en présence d'un acide fort, donnent des dérivés du furfural qui peuvent se condenser avec des composés phénoliques pour donner des complexes colorés. Cependant, il nous semble utile de rappeler

qu'elles ne conduisent à des résultats exacts qu'à condition d'opérer avec une verrerie très propre et des réactifs, en particulier de l'acide sulfurique, très purs. D'autre part, il est nécessaire de faire des blancs et d'introduire dans chaque série de dosages des tubes étalons contenant des quantités connues de glucides, la droite de référence n'ayant jamais rigoureusement la même pente d'un dosage à l'autre. Leur principale imperfection tient au fait que les divers constituants glucidiques d'un polyside donnent des colorations qui diffèrent par leur intensité et la longueur d'onde de leur absorption maximum.

MÉTHODE A L'ORCINOL :

Nous avons adopté la méthode de RIMINGTON (299) qui est une modification de celle de TILLMANS et PHILIPPI (370), en suivant le mode opératoire décrit par MONTREUIL et SCHEPPLER (245).

Cette méthode est basée sur l'obtention d'une coloration orangée que donnent les oses, à chaud, en présence d'une solution sulfurique d'orcinol (*). Cette coloration est stable pendant 6 heures; on mesure la densité optique à 510 m μ . SUDHOF et coll. (364, 365) avaient déjà montré la grande spécificité de la réaction à l'orcinol; MONTREUIL et SCHEPPLER (245) ont établi que, dans les conditions expérimentales adoptées, il n'y avait aucune interférence des acides aminés.

On peut ainsi doser entre 100 et 400 μ g de glucides. Il suffit d'introduire dans chaque série de dosages un « témoin interne » contenant, par exemple, 200 μ g de glucides totaux.

MÉTHODE A L'ANTHRONE.

Nous avons utilisé la technique de SCOTT et MELVIN (335), très facile à mettre en œuvre, le mode opératoire étant bien précisé. Cette méthode est basée sur la coloration verte que donnent les oses, à chaud, avec une solution sulfurique d'anthrone (**). L'intensité de la coloration est déterminée immédiatement à 625 m μ . On dose ainsi entre 100 et 200 μ g de glucides.

Nous avons constaté que les hexosamines n'intervenaient pas dans la réaction. En revanche, bien que cette méthode soit très utilisée, on manque de renseignements sur l'interférence des acides aminés dans le dosage (90).

(*) Nous avons utilisé : Acide sulfurique pur R.P. (d 1,83) ; Orcinol pur R.P.

(**) Anthrone pure pour analyses, Serlabo, 26, rue Saint-Gilles, Paris-III^e.

Dosage des hexosamines.

Ce dosage nécessite également une hydrolyse préalable, qui doit être plus intense que celle nécessaire pour libérer les oses non aminés; en effet, dans les glycoprotéines, les hexosamines sont très fortement liées. Il semble que l'on doive attribuer cette propriété à la présence d'un groupement aminé en position 2, car, lorsque celui-ci est substitué, l'hydrolyse devient plus facile (119). Les hexosamines se distinguent également des oses non aminés, par le fait qu'elles résistent beaucoup mieux aux acides forts (245); il semble, cependant, que ce ne soit pas le cas de l'acide mura-mique (144).

Comme dans le cas précédent, il n'existe pas de méthode générale d'hydrolyse pour libérer les hexosamines d'une glycoprotéine. Néanmoins, GARDELL (119) a pu montrer que l'utilisation de l'acide chlorhydrique 6 N, à $+100^{\circ}\text{C}$, pendant huit heures, donne des résultats satisfaisants dans la plupart des cas. Nous avons adopté ces conditions, après avoir vérifié qu'elles donnaient une valeur maximum pour les différentes fractions que nous avons étudiées.

Avant que l'on procède au dosage des hexosamines libérées, l'hydrolysats chlorhydrique est centrifugé pour éliminer les traces d'humine formées. On évapore, sous vide, une partie aliquote du surnageant, en présence d'anhydride phosphorique et de potasse. Après dessiccation, le résidu est repris dans de l'eau distillée puis soumis à une nouvelle évaporation. On le redissout, finalement, dans un volume d'eau distillée correspondant au volume de la prise d'essai. On a ainsi un hydrolysats débarrassé de l'acide chlorhydrique.

Nous avons d'abord effectué nos dosages, sur l'hydrolysats, en suivant la technique originale d'ELSON et MORGAN (104) qui ont montré que les hexosamines, après acétylation, se transforment en dérivés oxazoliques, lorsqu'on les chauffe en milieu alcalin. Elles réagissent alors avec le réactif d'Ehrlich (*), pour donner une coloration rose dont on détermine l'intensité à 550 m μ . L'acétylation et la cyclisation sont obtenues simultanément en traitant, à chaud, par une solution carbosodique d'acétylacétone.

Cette méthode peut être entachée d'erreur par excès, à cause de l'interférence des produits de dégradation des oses fortement colorés (245). D'autre part, certains oses, en présence d'acides

(*) Solution chlorhydrique de para-diméthylaminobenzaldéhyde.

aminés, peuvent donner lieu à la formation de complexes réagissant avec le réactif d'ELSON et MORGAN (119, 245). C'est le cas, en particulier, des cétooses et de la lysine (245). Aussi, la méthode originale n'a-t-elle cessé d'être modifiée, afin d'éliminer ces sources d'erreurs.

Pour éviter l'interférence des produits étrangers, BOAS (27) propose de séparer les hexosamines par une fixation sur une résine acide, suivie d'une élution. Nous avons utilisé, de préférence à cette méthode, la technique de MONTREUIL (245) qui est une modification de celle de BELCHER (19). Elle se distingue de la méthode originale d'ELSON et MORGAN, par l'utilisation d'une solution carbonodique d'acétylacétone plus concentrée et par une colorimétrie faite à 510 m μ au lieu de 550. Dans ces conditions, on peut doser les hexosamines, en présence de quantités importantes d'oses et d'acides aminés, sans que ceux-ci interviennent dans la coloration (245).

La principale source d'erreur dans le dosage des hexosamines, est due à la présence d'acide muramique, dont le comportement dans la réaction d'ELSON et MORGAN diffère légèrement de celui de la glucosamine (353, 355).

Dosage des acides aminés.

Avant de procéder au dosage des acides aminés, il est nécessaire de les libérer des constituants protéiques par une hydrolyse acide. Bien que de nombreuses études (140, 152, 339, 340) aient été consacrées à l'hydrolyse acide des protéines, on n'a pas pu définir de méthode type pour le cas des protéines de la paroi bactérienne. La plupart des auteurs s'accordent pour préconiser l'utilisation de l'acide chlorhydrique 6 N; mais, en revanche, de grandes divergences se manifestent quant à la température et à la durée de l'opération.

Comme cette hydrolyse risque, ou bien d'être incomplète, ou bien de détruire une partie des acides aminés, nous avons recherché systématiquement les conditions nécessaires pour l'obtention d'une valeur maximale, après avoir adopté, pour des raisons de commodité, la température de + 100°C, déjà utilisée par plusieurs auteurs (73, 341) pour l'hydrolyse des protéines de la paroi, et la concentration 6 N en acide chlorhydrique. Dans ces conditions, nous avons trouvé que, pour une solution ou suspension à 0,05 % de produit à analyser, le taux d'acides aminés libérés atteint un maximum au bout de 20 heures.

L'hydrolyse est réalisée dans des ampoules en verre Pyrex qu'on scelle sous vide et qu'on plonge dans un bain-marie bouillant. Ce procédé est supérieur à l'ébullition sous reflux, car il permet de mieux contrôler la température et d'éviter les dégradations qui se produiraient en présence d'oxygène.

Après refroidissement, les hydrolysats sont centrifugés pour éliminer les traces d'humine. On prélève une partie aliquote du surnageant qu'on dessèche sous vide, en présence de potasse pour fixer l'acide et d'anhydride phosphorique pour fixer l'eau. Le résidu sec est finalement redissous dans un volume d'eau égal à la moitié du volume primitif.

Les acides aminés ont été dosés par la méthode de MOORE et STEIN (246) et par celle de KEMBLE et MACPHERSON (187).

La première de ces méthodes est basée sur la coloration bleue que donnent les groupements α aminés libres avec la ninhydrine. Nous avons suivi le mode opératoire décrit par SPIES (345) en opérant par rapport à une solution témoin de leucine (*).

Cette méthode conduit à des erreurs par excès, car les hexosamines, les peptides non hydrolysés ainsi que l'ammoniaque formée au cours de l'hydrolyse interviennent dans la réaction. Elle a l'avantage d'être très sensible, puisqu'elle permet de doser de l'ordre de 2,5 μ g d'azote aminé avec une précision de 2 %.

La méthode de KEMBLE et MACPHERSON (187) est une amélioration de celle de COHEN (53 bis), qui a remarqué que la Chlo-ramine T (**) décarboxyle les acides aminés à la température ordinaire. Cette réaction est quantitative et semble spécifique des acides α aminés libres, ce qui permet de les doser en présence de peptides et de protéines.

L'opération se faisant à basse température, on peut l'effectuer à l'appareil de WARBURG, ce qui rend possibles les dosages en série. Nous avons suivi le mode opératoire décrit par COLO-BERT (54).

(*) Lorsqu'on dose un mélange de plusieurs acides aminés, on utilise, en général, comme témoin une solution de leucine (345).

(**) Sel de sodium de la para-toluène-sulfone chloramide. Nous avons utilisé le produit Prolabo. Avant l'emploi, il est nécessaire de procéder à deux cristallisations successives : on dissout 50 g de produit dans 100 ml d'eau bouillante. On refroidit à 0° et on filtre sur Büchner. Les cristaux sont lavés rapidement à l'eau froide et séchés sous vide.

Dosage des lipides.

Il n'existe pas de méthode générale de dosage des lipides. La quantité de lipides qu'on peut extraire d'une substance biologique, dépend de la nature de celle-ci et des solvants utilisés.

Dans le cas particulier de la paroi ectoplasmique, on trouve à la fois des lipides non liés, faciles à extraire, et des lipides combinés, solidement liés à des protéines et à des glucides. Si l'on veut extraire la totalité des constituants lipidiques, il est nécessaire de provoquer, d'abord, une rupture des liaisons. Plutôt que de recourir à une hydrolyse acide ou alcaline, qui aurait nécessairement entraîné des modifications importantes des constituants, nous avons préféré l'utilisation de l'éthanol anhydre qui, dans la plupart des cas, suffit pour détacher les lipides. Mais, cet alcool étant un mauvais agent de dissolution des lipides, il est nécessaire de faire suivre cette opération d'une extraction par d'autres solvants.

En pratique, pour doser les lipides totaux des parois ectoplasmiques, nous avons suivi la méthode de référence décrite par Mlle FAURE (106). Les parois lyophilisées et desséchées sous vide sont d'abord soumises à une coagulation, par ébullition sous reflux dans de l'éthanol anhydre. Elles sont ensuite introduites quantitativement dans la cartouche d'un appareil de KUMAGAWA et soumises à des extractions successives par l'éthanol anhydre, l'éther anhydre déperoxydé et le benzène. Tous les extraits obtenus sont réunis. On élimine les solvants par distillation sous vide, et on dessèche le résidu obtenu. Celui-ci est alors repris par du chloroforme. Par évaporation de la solution chloroformique, on obtient les lipides totaux que l'on pèse après dessiccation.

Dans le cas de l'antigène somatique et du substrat du lysozyme, nous avons adopté un mode opératoire différent. Il s'agissait, avant tout, d'isoler des constituants lipidiques analogues à ceux déjà obtenus à partir d'autres bactéries à Gram négatif, dans des conditions bien précises.

Nous avons d'abord dosé les lipides non liés, en procédant à une extraction par l'éther anhydre et déperoxydé dans un appareil de KUMAGAWA. L'extrait étheré obtenu est évaporé. Le résidu est repris, après dessiccation, par du chloroforme. On évapore le solvant et on pèse le résidu après l'avoir desséché.

Pour le dosage des lipides liés, nous avons suivi, scrupuleusement, la technique utilisée par WESTPHAL et coll. (118, 397, 405) pour la préparation du lipide A. Le produit partiellement délipidé par l'éther, est hydrolysé par l'acide chlorhydrique N, à $+100^{\circ}\text{C}$,

pendant 60 minutes. Le précipité formé est séparé par filtration sur filtre en verre fritté G 3, desséché sous vide en présence d'anhydride phosphorique et de potasse, puis repris par du chloroforme. On évapore le solvant et on pèse le résidu après dessiccation.

Dosage de l'azote total.

Au début de ces travaux, nous utilisons la microméthode colorimétrique de LUBOCHINSKY et ZALTA (213), basée sur la coloration bleue que donne l'ammoniaque en présence de phénol et d'un hypochlorite. Cette méthode comporte une minéralisation par le peroxyde d'hydrogène en milieu sulfurique. Elle présente les avantages d'utiliser directement le liquide de minéralisation et d'être très sensible, puisqu'elle permet de doser entre 0,5 et 10 μg d'azote. Mais elle exige de grandes précautions, en particulier pour la préparation des réactifs, qui doivent être faits avec une eau ne contenant pas de traces d'ammoniaque, et des produits chimiques très purs. D'autre part, ces réactifs se conservent mal.

Par la suite, nous avons utilisé la microméthode de KJELDAHL avec les modalités opératoires de MA et ZUAZAGA (217), moins sensible mais plus facile à mettre en œuvre, parce que les réactifs sont rapidement préparés et se conservent bien. L'indicateur coloré est un mélange vert de bromocrésol - rouge de méthyle; pour la minéralisation, nous nous sommes servis du mélange catalyseur suivant : SeO_3Na_2 , 5 H_2O , 3 g. — SO_4Cu , 5 H_2O , 6 g — SO_4K_2 , 100 g, à raison de 300 mg de mélange pour 1 ml d'acide sulfurique. Pour la distillation de l'ammoniaque, nous avons utilisé l'appareil de MARKHAM (227) (*).

Par cette méthode on peut minéraliser, directement dans des tubes à essais en verre Pyrex, des prises d'essais comprises entre 5 et 10 mg de produit, pesées dans des microgodets de verre. Des dosages effectués sur des prises d'essais témoins d'urée nous ont donné une erreur inférieure à 2 %.

Dosage du phosphore total.

Nous avons utilisé la microméthode colorimétrique de FISKE et SUBBAROW (109), décrite par Mlle FAURE (106). Elle consiste à détruire la matière organique en milieu sulfurique par un mélange nitro-perchlorique. L'acide phosphorique obtenu est transformé en acide phosphomolybdique que l'on réduit par de l'acide l amino-

(*) Depuis, nous avons repris l'appareil classique de Parnas et Wagner, d'usage moins aléatoire.

2 naphthol - 4 sulfonique. Il se forme une coloration bleue dont on détermine l'intensité à 720 m μ .

Le dosage suit la loi de Beer entre 5 et 100 μ g de phosphore; il peut être effectué très rapidement.

2. — IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS

L'utilisation de la chromatographie de partage sur papier a permis d'identifier certains constituants de la paroi ectoplasmique. Tous les essais ont été réalisés avec du papier *Arches* 302, sans lavage préalable. Nous avons vérifié la pureté de chacune des substances témoins par chromatographie.

Identification des oses.

Afin d'éviter la formation de traînées sur les chromatogrammes, nous avons d'abord éliminé de l'hydrolysate acide les ions minéraux et les produits de dégradation des protéines, en utilisant la technique de MONTREUIL (245). Pour cela, on fait passer successivement l'hydrolysate sur une colonne d'un échangeur de cations, la Permutite 60 (*) sous forme acide, puis sur une colonne d'échangeur d'anions, l'Amberlite XE-67 (**) sous forme formiate. L'effluent ainsi que les eaux de lavage sont ensuite lyophilisés. Le résidu sec est repris dans une petite quantité d'eau et soumis à l'analyse chromatographique dans les systèmes - solvants : n butanol/pyridine/acide chlorhydrique 0,1N — 5/3/2 (descendante, 20 heures) (38); n butanol/pyridine/eau — 45/25/40 (ascendante multiple, 3 fois) (125); n butanol/acide acétique/eau — 4/1/5 (descendante) (274).

On révèle les constituants par une solution de phtalate d'aniline contenant : acide phtalique 1.66 g; aniline 0.93 g; butanol saturé d'eau q.s.p. 100 cm³. Il se forme des taches brunes après chauffage à + 105°C pendant 5 minutes.

Identification des hexosamines.

On part directement de l'hydrolysate chlorhydrique, dont on a éliminé l'acide et l'eau par évaporation sous vide en présence de potasse et d'anhydride phosphorique. Le résidu sec, repris par un peu d'eau, est soumis à des chromatographies descendantes

(*) Résine analogue à la Permutite 50.

(**) Variété pharmaceutique à l'Amberlite IRA - 400. ROHM and HAAS company - The Resinous Products Division, Philadelphia 5, Pennsylvania.

dans les systèmes - solvants suivants : n butanol/acide acétique/eau — 4/1/5 (274) ; n butanol/pyridine/eau — 6/4/3 (69) ; phénol/eau — 100/10, en atmosphère saturée d'ammoniaque à 0,3 %.

Pour chaque chromatographie, on fait une révélation au phtalate d'aniline (26), au nitrate d'argent ammoniacal (274) et au réactif d'ELSON et MORGAN, suivant la technique de PARTRIDGE (274). Le déplacement de chacune des hexosamines est déterminé par rapport à celui du glucose (Rg).

Identification des acides aminés.

On procède d'abord à la séparation des acides aminés suivant la méthode de BOULANGER (37). L'hydrolysât, dont on a éliminé l'acide chlorhydrique par évaporation, est passé sur une colonne de Permolyte 60, sous forme acide, qui fixe les acides aminés. Après lavage de la colonne à l'eau distillée, on déplace ceux-ci par une solution normale d'ammoniaque. L'éluat est évaporé sous vide, puis repris par une petite quantité d'eau et lyophilisé.

Dans un premier temps, on procède à des chromatographies unidimensionnelles dans les systèmes — solvants : phénol/eau-100/10, en atmosphère saturée d'ammoniaque à 0,3 % (descendante) ; butanol t e r t i a i r e /méthyl-éthyl-cétone/eau/diéthylamine-40/40/20/4 (ascendante). Puis on effectue une chromatographie bidimensionnelle ascendante avec les systèmes — solvants : méthanol/eau/pyridine — 80/20/4, puis butanol t e r t i a i r e /méthyl-éthyl-cétone/eau/diéthylamine-40/40/20/4 (293).

Les constituants sont révélés à $+90^{\circ}\text{C}$ par une solution de ninhydrine contenant : ninhydrine 0,1 g ; acide acétique 5 cm³ ; n butanol 95 cm³.

L'acide diaminopimélique est séparé par chromatographie ascendante, dans le système — solvant de HOARE et WORK (155) : méthanol/eau/acide chlorhydrique 10N/pyridine — 80/17,5/2,5/10, puis révélé spécifiquement par la méthode de BLASS (25).

CHAPITRE II

PREPARATION DES BACTERIES

La bactérie étudiée est la souche 0-901 d'*Eberthella typhi*, que l'on sait exempte d'antigène Vi, peu riche en antigène H, et dont la composition antigénique 0 est IX, XII₁, XII₂, XII₃.

La culture a été pratiquée en milieu liquide glucosé, oxygéné et agité, préparé de la manière suivante.

Dans une marmite en aluminium, on introduit 300 g d'hydrolysats de caséine (*) et 14,7 litres d'eau du robinet. On dissout en chauffant légèrement et en agitant. On ajuste le pH à 7,4 par addition de soude à 50 % (environ 10 cm³). On ajoute une petite quantité d'antimousse (**).

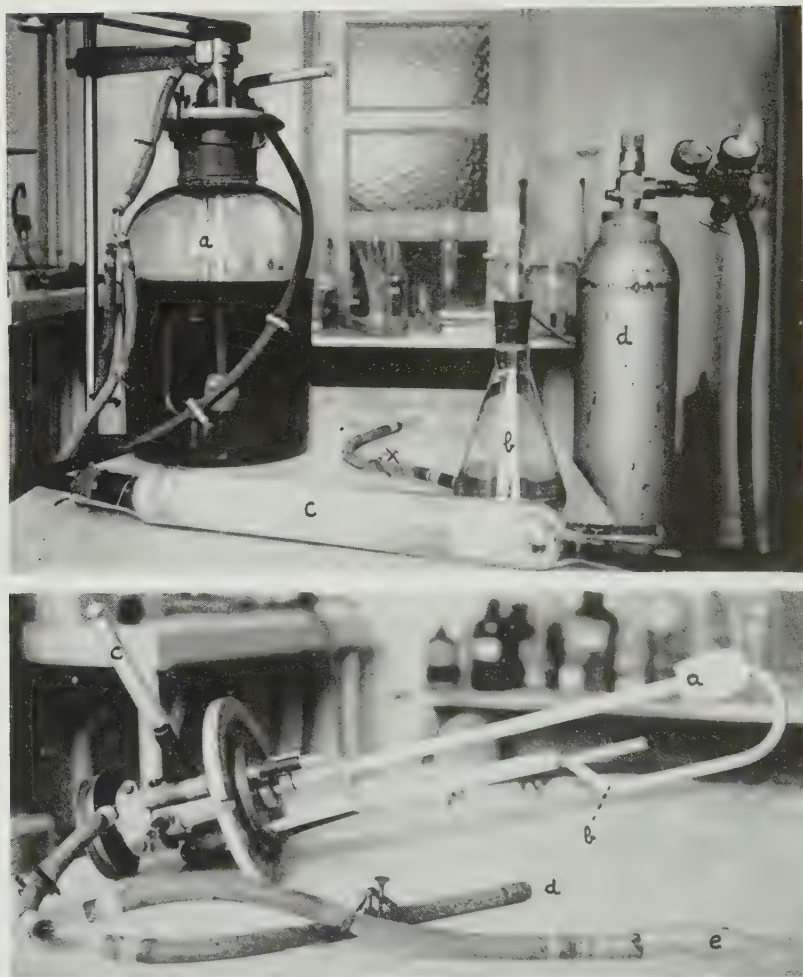
Dans un flacon conique, on prélève un échantillon de 500 cm³ qui servira à la préculture. Le reste est versé dans un flacon en Pyrex de 20 litres à col large. On monte sur ce flacon la turbine en forme de bicône (***) qui servira à l'agitation et à l'aération, et on stérilise à l'autoclave à + 120°C, l'appareil monté (fig. 1). L'appareil encore chaud, est installé dans une chambre dont la

(*) Industrie Biologique Française, 35, 49, quai du Moulin-de-Cage, Genevilliers (Seine).

(**) S.I. Antimousse A.F. en émulsion. Société Industrielle des Silicones et des Produits Chimiques, 1 bis, place des Saussaies, Paris-8^e.

(***) ROUYER, PILLET, ORTA et NICOL (304) ont décrit l'emploi d'une turbine commercialisée sous le nom de « Bicône Thiberge » (Etablissements Thiberge, 56, avenue de Chatou, Rueil, Seine-et-Oise), facile à adapter aux flacons en Pyrex du commerce et qui permet l'agitation et l'aération profonde.

FIGURE I



En haut : Vue d'ensemble de l'appareil de culture ; a) Flacon contenant le milieu ; b) Flacon de préculture ; c) Colonne d'amiante ; d) Bouteille d'oxygène.

En bas : Détail de la turbine ; a) Turbine en téflon ; b) Arrivée d'oxygène ; c) Sortie d'oxygène ; d) Orifice pour ensemencement ; e) Orifice pour prélèvements stériles.

température est réglée à $+37^{\circ}\text{C}$ et on attend que l'équilibre des températures soit réalisé. On introduit alors, par une tubulure spéciale, 300 cm³ d'une solution de glucose à 50 % stérilisée par filtration.

En vue de la préculture, on inocule, avec les bactéries développées en 24 heures à $+37^{\circ}\text{C}$ sur la surface d'un tube de gélose inclinée, le flacon de préculture qui a été stérilisé en même temps que l'appareil complet. On laisse les bactéries se développer pendant 20 heures à $+37^{\circ}\text{C}$, dans le flacon de préculture. On introduit alors le contenu de celui-ci dans l'appareil contenant les 14,5 litres de milieu nutritif. L'oxygénation du milieu est assurée par l'introduction, sous la turbine, d'oxygène provenant d'une bouteille de gaz comprimé, stérilisé par filtration sur une colonne de poudre d'amiante stérile de 50×500 mm. L'oxygénation et l'agitation sont poursuivies sans arrêt jusqu'au moment de la récolte, à laquelle on procède à la 48^e heure.

A ce moment, le développement maximum étant atteint, les bactéries sont recueillies par centrifugation dans une centrifugeuse Sharples tournant à 50.000 t/mn. L'opération dure 2,30 heures environ. Le culot bactérien est aussitôt remis en suspension dans un tampon phosphate 0.066 M de pH 7,17, dont la composition est la suivante : $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, $12\text{H}_2\text{O}$: 16,717 g; PO_4KH_2 : 2,723 g; eau q.s.p. 1 litre.

On ajuste la densité optique de cette suspension, de telle manière qu'en la diluant au 1/25 elle soit égale à 0,970 à 720 m μ . La suspension est alors répartie en ampoules que l'on scelle, à raison de 20 cm³ par ampoule. Le rendement moyen d'une récolte est de 300 cm³ de suspension, ce qui correspond à 7,7 g de bactéries sèches.

CHAPITRE III

OBTENTION ET PROPRIETES DES PAROIS ISOLEES

Les procédés mécaniques qui permettent de préparer des parois isolées, ont l'inconvénient de laisser souvent persister des fragments de cytoplasme et de membrane cytoplasmique, ainsi que le montrent des coupes minces examinées au microscope électronique (389 *ter*). Les procédés enzymatiques y obviennent; mais ils modifient chimiquement la paroi, en dissolvant des éléments qui lui appartiennent en propre, la perte de poids pouvant atteindre 45 % (144). Nous avons néanmoins fait appel à un de ces procédés, en utilisant la trypsine (*) dans des modalités voisines de celles employées par SALTON et HORNE (308, 309). Cet enzyme ne risque pas, en effet, d'altérer les fractions polyosidiques de la paroi, parmi lesquelles doit se trouver le substrat du lysozyme. De plus, du fait de la spécificité d'action très étroite de la trypsine, du fort pourcentage de formes dextrogyres des acides aminés dans les fractions polypeptidiques et de la très faible teneur en acides aminés basiques de la paroi, on pouvait espérer que le nombre de liaisons rompues — s'il y en avait — serait extrêmement faible. Malheureusement, des essais préliminaires, en accord avec les observations d'autres auteurs, ont montré que la trypsine n'attaquait nullement le pro-

(*) La trypsine purifiée de l'Institut Pasteur de Paris donnant les mêmes résultats que la trypsine trois fois cristallisée, nous avons fait appel à elle exclusivement.

toplasme des bactéries vivantes et qu'il était nécessaire, pour obtenir ce résultat, de coaguler le protoplasme, soit que l'enzyme ne puisse pénétrer qu'à l'intérieur des cellules tuées, soit qu'il soit nécessaire de dénaturer les protéines protoplasmiques pour que celles-ci puissent être hydrolysées. On procède donc à un chauffage ménagé, dans les conditions qui permettent d'obtenir la lyse par le lysozyme (58, 60).

Il est très difficile d'évaluer les altérations provoquées dans la paroi même, par l'usage de la trypsine. Une chose est certaine, après la digestion enzymatique, l'addition de *Teepol* commercial désintègre totalement les parois, alors qu'il n'est rien sur les bactéries entières. Peut-être ce fait est-il la conséquence de l'hydrolyse, par la trypsine, de quelque élément protéique de la texture pariétale; mais peut-être aussi est-il la conséquence d'un accès direct de la substance tensioactive à la surface interne de la paroi, normalement inaccessible dans la bactérie entière.

Les modalités opératoires sont les suivantes : Les ampoules scellées contenant les bactéries en tampon phosphate, sont immergées dix minutes exactement dans un bain-marie bouillant à $+100^{\circ}\text{C}$, puis laissées refroidir avant d'être stockées à $+4^{\circ}\text{C}$. Elles peuvent se conserver indéfiniment dans cet état sans altération.

Lorsqu'on dispose d'un minimum de 6 récoltes (soit environ 40 g de bactéries sèches), les bactéries sont recueillies par centrifugation. Elles sont lavées dans le tampon phosphate, puis finalement remises en suspension dans le même tampon. La suspension est alors ajustée une nouvelle fois, de manière à présenter la densité optique de 0,970 à 720 m μ , pour une dilution de 1/25.

A cette suspension, on ajoute une solution de trypsine préparée extemporanément (5 mg par cm³ dans le tampon phosphate), à raison de 3 cm³ pour 27 cm³ de suspension. On ajoute quelques gouttes de toluène pour éviter les fermentations et on incube à $+37^{\circ}\text{C}$ pendant 12 heures. On centrifuge alors 30 minutes à 19.000 t/mn., pour séparer l'insoluble du surnageant.

Le culot est remis en suspension dans le volume primitif de tampon phosphate et on recommence une trypsination identique à la précédente, que l'on prolonge pendant 24 heures. Après cela, l'opération est encore répétée 3 fois, ce qui fait un total de 5 trypsinations. Finalement, le culot est remis en suspension dans un

(*) Solution à 21 % d'alcoylsulfates secondaires. Produit Shell, Saint-Gobain.

petit volume d'eau distillée et dialysé contre de l'eau distillée pendant 48 heures. L'examen au microscope photonique après coloration, mais surtout l'examen au microscope électronique, permet de constater que toute trace de protoplasme a disparu; seules persistent les parois vides.

TABLEAU I
CARACTERISTIQUES DE LA TRYPSINATION

<i>Rendement : 6 récoltes donnent 7,9 g de parois (poids sec), soit 17 p. 100 du poids sec des bactéries.</i>	
Variations de la densité optique à la suite des traitements par la trypsine :	
Au départ	0,970
Après la première trypsination	0,250
Après la deuxième trypsination	0,200
Après la troisième trypsination	0,110
Après la quatrième trypsination	0,100
Après la cinquième trypsination	0,090

Composition chimique des parois isolées.

Nous avons procédé au dosage des glucides, des lipides et de l'azote total dans les parois isolées. Ces dosages ont été effectués sur des parois séchées d'abord par lyophilisation puis par extraction sous vide, en présence d'anhydride phosphorique, jusqu'à poids constant.

Les glucides réducteurs ont été dosés par la méthode de SOMOGYI (343), après une hydrolyse dans l'acide chlorhydrique 0,5 N à + 100°C pendant 8 heures. Leur taux, exprimé en glucose, est compris entre 15,48 et 17 % selon les échantillons.

La teneur en lipides totaux a été évaluée par la méthode de référence décrite par Mlle FAURE (106). Le taux trouvé est de 30,3 %. A ce stade, nous n'avons pas dosé séparément les lipides non liés et les lipides liés.

Le taux d'azote total, dosé par la méthode de LUBOCHINSKY et ZALTA (213) est de 5,55 %. En supposant que tout cet azote provienne des acides aminés — ce n'est sûrement pas le cas, puisque nous avons caractérisé notamment des hexosamines — et en admettant que l'azote représente en moyenne la 6/25^e partie du poids moléculaire de ces derniers, on trouve que la fraction protéique du constituant isolé représenterait près de 35 % du poids total.

Action du lysozyme sur les parois isolées.

En 1957, COLOBERT (55, 59, 60) a montré que la paroi externe des principales salmonelles pathogènes pour l'homme : *Eberthella typhi*, *Salmonella para A* et *Salmonella para B*, pouvait être dissoute par le lysozyme, à condition que celles-ci aient été au préalable sensibilisées, soit par un chauffage ménagé, soit par un traitement par l'E.D.T.A. tétrasodique (*) ou par des alcoylsulfates (**). En suivant la lyse au photomètre et au microscope électronique, les conditions d'expérience suivantes furent reconnues optimales : On prépare la suspension bactérienne en tampon tris 0,05 M de pH 8,5 (***), contenant de l'E.D.T.A. tétrasodique à la concentration de 27 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. On ajoute alors le lysozyme (****) ; dans ces conditions une concentration de 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ provoque une lyse rapide. Nous avons constaté qu'il en était de même quand on opère avec des parois isolées par la méthode qui vient d'être décrite. Pour être en mesure de doser les sucres réducteurs libérés, il est nécessaire d'opérer sur des quantités importantes de parois, ce qui nécessite de faire appel à une concentration plus élevée de lysozyme. D'une manière habituelle, nous avons effectué tous nos essais sur une suspension de parois contenant 21,5 mg de produit sec par cm^3 de tampon, ce qui correspond, après hydrolyse, à 3.320 μg de sucres réducteurs totaux, exprimés en glucose. On opère de la manière suivante :

Dans un tube à essais en Pyrex de 20×2 cm, on introduit successivement : 9,6 cm^3 de suspension de parois dans le tampon tris (21,5 mg/cm^3) ; 1,2 cm^3 de solution d'E.D.T.A. tétrasodique dans le tampon tris (2,66 mg/cm^3) ; 1,2 cm^3 de lysozyme en tampon tris (10 mg/cm^3).

On prépare un tube témoin identique, où le lysozyme est remplacé par 1,2 cm^3 de tampon tris, et un blanc ne contenant pas de parois. On porte ces trois tubes dans un bain-marie à $+ 37^\circ\text{C}$ pendant une heure. On ajoute alors dans chacun 1 cm^3 de solution à

(*) Sel tétrasodique de l'acide éthylène-diamine-tétracétique, commercialisé sous les noms de Versène et Complexon III.

(**) Il s'agit du « Teepol » commercial, qui est une solution à 21 % d'alcoyl-sulfates secondaires. Shell Saint-Gobain, 29, rue de Berri, Paris.

(***) Tri hydroxyméthyl-amino-méthane : Serlabo, 26, rue Saint-Gilles, Paris. Pour obtenir un tampon 0,2 M, on prépare tout d'abord une solution contenant 24,2 g de tris pour 1000 cm^3 , puis une solution d'acide chlorhydrique 0,2 N. Le pH de 8,5 est obtenu en mélangeant 25 cm^3 de la solution de tris, 825 cm^3 de solution acide et en complétant à 100 cm^3 avec de l'eau distillée.

(****) Lysozyme « cristallisé » prepared from egg white : not for drug use. Lab. Armour Research division - Union Stock Yards, Chicago 9 (Illinois).

12 % de chlorure de sodium dans de l'eau distillée, ce qui a pour effet d'améliorer le rendement de la réaction. Après agitation, on remet les tubes au bain-marie pendant une heure.

On dose alors les glucides réducteurs libérés. Pour cela, on centrifuge le contenu de chaque tube à 25.000 t/mn. pendant 30 minutes et on titre le pouvoir réducteur dans 5 cm³ de surnageant limpide, par la méthode de SOMOGYI (343).

Dans ces conditions, on constate que le lysozyme a libéré 194 µg de glucides réducteurs par cm³ de surnageant, soit 7,9 % des glucides réducteurs totaux obtenus par hydrolyse de la suspension de parois. Si on laisse la réaction se poursuivre pendant 24 heures, ce taux atteint 263 µg/cm³, soit 10,7 % des glucides totaux. Les glucides libérés ne sont d'ailleurs pas des monoses, car si on hydrolyse ces surnageants 8 heures à + 100°C dans l'acide chlorhydrique 0,5 N, le taux des glucides réducteurs a passé par exemple dans une expérience, de 185 µg/cm³ à 449 µg/cm³, soit 2,42 fois plus.

Une part importante des glucides qui passent en solution sous l'action du lysozyme est constituée d'hexosamines. On l'a mis en évidence de la manière suivante.

Dans trois ampoules de 5 cm³, on introduit 2 cm³ de surnageant de chacun des tubes et 1 cm³ d'acide chlorhydrique 12 N (ce qui fait une concentration finale de 4 N). On hydrolyse 12 heures à + 100°C. L'hydrolysate est ensuite évaporé à sec et repris par 2 ml d'eau. On y dose les hexosamines par la méthode d'ELSON et MORGAN (104), en utilisant la technique décrite par Mlle STAUB (348).

Alors que le témoin ne contient pas d'hexosamines, on trouve que le lysozyme en a libéré, pour 1 cm³ de surnageant, 153 µg exprimés en glucosamine. Le dosage des glucides réducteurs ayant donné 185 µg/cm³ au cours de la même réaction, le pourcentage des hexosamines par rapport aux glucides libérés est de 82,7 %, ce qui représente 6,25 % des glucides réducteurs totaux contenus dans les parois.

CHAPITRE IV

SEPARATION DES CONSTITUANTS DE STRUCTURE A PARTIR DES PAROIS ISOLEES

COLOBERT (55, 60) avait montré que les parois de salmonelles ayant subi une trypsination consécutive à un chauffage ménagé, avaient acquis la propriété de se dissoudre complètement dans une solution diluée de Teepol commercial; alors qu'il n'en est rien pour des bactéries vivantes ou des bactéries trypsinées. Nous avons utilisé cette propriété pour séparer les éléments des parois. Par ce procédé peu traumatisant, on peut en effet espérer obtenir les éléments de structure, ce que ne permettent pas les hydrolyses acides ou alcalines auxquelles il a fallu faire appel jusqu'à présent pour obtenir la dissolution totale des parois.

On opère de la façon suivante : La suspension de parois est dialysée contre de l'eau distillée, de façon à se trouver débarrassée des sels et des substances de faible poids moléculaire éventuellement libérées par la trypsine, puis ajustée de telle manière qu'une dilution au demi présente une densité optique de 0,970 à 720 m μ . On ajoute alors la solution commerciale de Teepol, à raison de 0,3 cm³ pour 2,7 cm³ de suspension. Le mélange est agité, pendant 2 heures au minimum, à la température du laboratoire. La densité optique, mesurée dans les mêmes conditions, tombe alors entre 0,500 et 0,600. On centrifuge cette suspension à 6.000 t/mn, pendant 30 minutes. On obtient ainsi un surnageant limpide. Les culots

se montrent constitués de produits amorphes, non organisés, non réducteurs (*).

La présence de Teepol, même à l'état de trace, inhibe l'activité enzymatique du lysozyme et il est nécessaire, à ce stade, d'éliminer totalement du surnageant cette substance tensioactive. Cette opération s'est avérée extrêmement difficile. Elle a été réalisée finalement en s'appuyant sur les propriétés suivantes que nous avons pu mettre en évidence :

— Le Teepol additionné d'un sel de baryum soluble, précipite en partie, en même temps que les sulfates contenus dans le produit commercial;

— Après cette addition de baryum, l'agitation avec une résine anionique permet d'éliminer les cations et de transformer en acides correspondants les alcoylsulfates du Teepol; les acides alcoylsulfuriques obtenus sont solubles dans l'éthanol, même anhydre, ce qui permet leur extraction;

— Le substrat du lysozyme forme lui-même une combinaison insoluble avec le baryum.

Les opérations sont menées de la façon suivante : on mesure le volume V du surnageant obtenu après l'addition de Teepol. On ajoute, sous agitation magnétique constante, une solution aqueuse à 25 % de chlorure de baryum ($\text{Cl}_2\text{Ba} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), à raison de 2 cm^3 pour 30 cm^3 de surnageant. Il se forme un abondant précipité. Après une agitation supplémentaire de 30 minutes, on sépare le précipité qui contient les constituants pariétaux, par centrifugation à 6.000 t/mn. pendant 30 minutes. Celui-ci est alors remis en suspension dans de l'eau distillée, en ramenant le volume à V.

Toujours sous agitation, on ajoute une suspension, dans de l'eau distillée, de résine XE-66B (**) sous forme acide, à raison de 10 cm^3 de suspension de résine pour 100 cm^3 de suspension de culots. On obtient aussitôt deux phases; d'une part un précipité constitué par la résine qui a fixé les cations, et d'autre part un surnageant opalescent qui contient les constituants des parois bacté-

(*) L'analyse de ces produits nous a donné les résultats suivants : 12 % de substances réductrices exprimées en glucose, après hydrolyse dans HCl 0,5 N à + 100° C pendant 8 heures ; 40 à 50 % de lipides extractibles par la méthode de référence (106), suivant les échantillons ; 20 % de cendres après calcination ; 0,85 % d'azote total.

(**) Variété pharmaceutique de l'Amberlite IR - 120, résine anionique puissante capable de fixer les ions d'une solution de sulfate de sodium (Rohm and Haas Company, Philadelphia, 5, Pennsylvania).

riennes sous forme colloïdale, et notamment le substrat du lysozyme, mais aussi les acides alcoylsulfuriques du Teepol. On écarte la résine par centrifugation à 6.000 t/mn. pendant 30 minutes.

Dans des ampoules à décantation de 1 litre, on introduit 685 cm³ d'éthanol à 95 % et 100 cm³ de surnageant. Après agitation, on laisse reposer une nuit à + 4°C. L'insoluble se décante. On le soutire et le concentre par centrifugation à 6.000 t/mn pendant 20 minutes. Il est alors lavé trois fois dans l'éthanol anhydre. Toutes ces opérations, depuis l'addition de baryum, sont poursuivies à la température de + 4° ± 2°C. Dans ces conditions, les acides alcoylsulfuriques sont entraînés par l'éthanol, et le précipité contient les constituants des parois débarrassés du Teepol. Ceux-ci représentent 1,547 g pour 7 récoltes de bactéries, soit 2,9 % du poids sec des bactéries ou 16,8 % du poids des parois sèches.

Séparation des constituants des parois précipités par le baryum.

On entreprend alors l'extraction de la fraction du précipité soluble dans le tampon tris hydroxyméthyl-amino-méthane — acide chlorhydrique 0,2 M de pH 8,5. On l'agite avec 250 cm³ de ce tampon pendant 6 heures, à la température du laboratoire, et le liquide d'extraction est recueilli par centrifugation à 25.000 t/mn. Le culot est repris une fois dans les mêmes conditions, puis deux nouvelles fois dans le même tampon contenant en plus, cette fois, 1,5 mg de sel de sodium de l'acide éthylène-diamine-tétracétique par cm³, afin d'extraire tout le baryum possible. On sépare ainsi deux fractions dont l'une est contenue dans le surnageant, tandis que l'autre demeure insoluble. On procède, pour toutes les deux, à une dialyse contre de l'eau distillée et on lyophilise le contenu des sacs de dialyse.

Le constituant insoluble représente environ 22 % de l'insoluble précipité par le baryum, soit 3,7 % du poids des parois ou 0,64 % du poids sec des bactéries. Le constituant soluble représente environ 78 % de l'insoluble précipité par le baryum, soit 13,1 % du poids des parois ou 2,27 % du poids sec des bactéries.

CHAPITRE V

PROPRIETES BIOLOGIQUES DES DEUX FRACTIONS ISOLEES

Les deux fractions ainsi isolées se sont montrées très différentes l'une de l'autre dans leurs propriétés biologiques. Tout d'abord, le lysozyme est absolument sans action sur la fraction soluble, alors qu'au contraire il libère des substances réductrices de nature glucidique lorsqu'on le fait agir sur le constituant insoluble. Les essais ont été conduits de la façon suivante :

Dans un tube à essais en Pyrex de 20×2 cm, on introduit successivement : 4 cm^3 de suspension de substrat à $1,6 \text{ mg/cm}^3$ dans le tampon tris, puis $0,25 \text{ cm}^3$ d'une solution d'E.D.T.A. tétrasodique à $2,66 \text{ mg/cm}^3$ dans le tampon tris, puis $0,25 \text{ cm}^3$ de solution de aqueuse chlorure de sodium à 12 %, enfin $0,50 \text{ cm}^3$ de solution de lysozyme à 10 mg/cm^3 dans le tampon tris. On maintient le tube deux heures dans un bain-marie à $+ 37^\circ\text{C}$. On prépare un témoin identique, mais dans lequel le lysozyme n'est ajouté qu'après la solution cuivrique servant au dosage des glucides. Ceux-ci sont dosés dans chaque tube par la méthode de SOMOGYI (343). On constate que dans le tube où le lysozyme a agi, il y a $140 \text{ }\mu\text{g}$ de glucides réducteurs de plus que dans le tube témoin. La prise d'essai correspond à $4 \times 1,6 = 6,4 \text{ mg}$ de produit titrant 9,13 % de glucides réducteurs, soit $584 \text{ }\mu\text{g}$. Le lysozyme a donc libéré 24 % des glucides réducteurs de la prise d'essai.

Effet pyrogène.

La fraction soluble est très pyrogène : si on injecte 1 µg par voie intraveineuse à des lapins, la température de ces derniers augmente, en moyenne, de 1°3. Au contraire, il faut injecter aux lapins, par voie intraveineuse, 1 mg de la fraction insoluble constituant le substrat du lysozyme, pour provoquer une augmentation de température de l'ordre de 1°.

Effet toxique.

La fraction soluble s'est révélée très toxique. Une seule injection intraveineuse de 1 mg suffit à tuer les lapins en quelques jours. Une seconde injection identique, quatre jours après la première, les tue en quelques heures.

En revanche, la fraction insoluble n'est pas toxique à la dose de 1 mg, par voie intraveineuse. Des injections répétées, à quatre jours d'intervalle, sont également parfaitement tolérées.

Propriétés immunologiques.

Nous avons utilisé trois lots de deux lapins. Ceux du lot I reçoivent, en injection intrapéritonéale, tout d'abord 0.1 cm³ d'une suspension dans 10 cm³ de solution de chlorure de sodium 0.07 M des germes récoltés sur la surface d'un tube de gélose inclinée incubé 24 heures à + 37°C, puis, huit jours et quinze jours plus tard, respectivement 0.2 et 0.5 cm³ d'une suspension identique.

Les lapins du lot II reçoivent dix injections intraveineuses de 1 µg de la fraction soluble, à raison de deux injections par semaine.

Ceux du lot III reçoivent huit injections intraveineuses de 1 mg de la fraction insoluble, à raison de 2 injections par semaine.

Tous les lapins sont sacrifiés dix jours après la dernière injection. On titre, par la méthode habituelle, le pouvoir agglutinant de chaque lot de sérums vis-à-vis de la souche d'*Eberthella typhi* 0-901 (concentration finale en bactéries : 25 millions de germes par cm³), (cf. tableau 2).

TABLEAU 2

Origine des sérums	Valeur moyenne des agglutinations vis-à-vis d' <i>Eberthella typhi</i> 0-901
Lot I	1/4096
Lot II	1/256
Lot III	1/256

Afin de mettre en évidence une antigénicité propre à la fraction insoluble, nous avons tenté des épreuves de saturation croisée. Pour cela, on introduit dans chaque série de tubes, 0,5 cm³ de la dilution de sérum et 0,25 cm³ d'une solution de chlorure de sodium 0,07 M contenant 5 mg de la fraction soluble par cm³. On agite et on laisse en contact une heure dans une étuve à + 37°C. Afin d'obtenir la concentration bactérienne habituelle, on ajoute alors dans chaque tube 0,25 cm³ d'une suspension d'*Eberthella typhi* 0-901, deux fois plus concentrée. Les lectures sont faites au bout de 24 heures (cf. tableau 3).

TABLEAU 3

Origine des sérums	Valeur moyenne des agglutinations de 0-901 après inhibition	Témoins sans inhibition
Lot I	1/64	1/4096
Lot II	1/32	1/256
Lot III	1/32	1/256

Nous avons également essayé d'inhiber ces agglutinations par les glucides identifiés dans la fraction soluble, et qui se trouvent être ceux de l'antigène somatique d'*Eberthella typhi* 0-901. On opère comme précédemment, en utilisant des solutions à 16 % de glucides, à l'exception du galactose, pour lequel, en raison de sa faible solubilité, nous avons utilisé une solution à 8 % (cf. tableau 4).

TABLEAU 4

Origine des sérums	Agglutination en présence de glucose	Agglutination en présence de mannose	Agglutination en présence de rhamnose	Agglutination en présence de galactose	Témoins sans inhibition
Lot I	1/4096	1/1024	1/4096	1/2048	1/4096
Lot II	1/128	1/128	1/256	1/128	1/256
Lot III	1/256	1/256	1/256	1/128	1/256

Comme le montre le tableau 3, on constate que l'agglutination d'*Eberthella typhi* 0-901 par les sérums obtenus à l'aide, soit des bactéries normales, soit de l'antigène soluble, soit de l'antigène insoluble, est fortement inhibée par la fraction soluble. Le taux d'agglutination résiduel n'est nullement modifié si on tente l'inhibition par une dose double d'antigène soluble.

On a cherché à mettre en évidence d'éventuelles propriétés haptènes des monoses entrant dans la composition de l'une ou l'autre fraction. Les résultats présentés dans le tableau 4, font apparaître, parmi les glucides essayés, un faible pouvoir inhibiteur du mannose et du galactose vis-à-vis des antisérums préparés par injection des bactéries non modifiées. Le même effet est obtenu dans le cas des sérums préparés par injection de l'antigène soluble. le glucose présentant également un faible pouvoir inhibiteur. Ce phénomène n'est constaté, dans le cas des sérums préparés par injection de la fraction insoluble, que pour le galactose.

Ces résultats sont en faveur de l'identité de la fraction soluble et de l'antigène somatique d'*Eberthella typhi* 0-901. En revanche, ils ne permettent pas de caractériser nettement une antigénicité propre à la fraction insoluble. Il se peut même que, sous cette forme insoluble, elle ne soit pratiquement pas antigénique et que les caractères des antisérums correspondants soient dus à la présence de traces de la fraction soluble.

En résumé, la fraction soluble et l'antigène somatique paraissent identiques par leurs propriétés toxiques et antigéniques. La fraction insoluble n'est pas identifiable par ces procédés.

CHAPITRE VI

COMPOSITION ET NATURE CHIMIQUE DU SUBSTRAT DU LYSOZYME ET DE L'ANTIGENE SOMATIQUE

1. Composition du substrat du lysozyme (*).

On a procédé au dosage du baryum, de l'azote, du phosphore, des glucides, des hexosamines, des lipides et des acides aminés dans le constituant hydrolysable par le lysozyme.

Le microdosage de l'azote total a été réalisé sur une prise d'essai de 7,95 mg, suivant la technique de MA et ZUAZAGA (217). Le taux d'azote trouvé est de 6,1 %.

Le phosphore total a été dosé, dans une prise d'essai de 7,10 mg, par la méthode de FISKE et SUBBAROW (109). Le taux est de 0,49 %.

La teneur en baryum a été évaluée par dosage gravimétrique du sulfate de baryum, obtenu en calcinant 93,7 mg de produit avec 0,5 cm³ d'acide sulfurique pur et en oxydant les sulfures éventuellement formés, par addition de quelques gouttes d'acide nitrique pur. Le taux de baryum ainsi trouvé est de 11,29 %.

(*) Cette étude a déjà fait l'objet d'une note (66).

Les oses totaux ont été tout d'abord dosés directement, sans hydrolyse, par la méthode à l'orcinol (245) et par la méthode à l'anthrone (335). On trouve respectivement 13,9 % et 7,9 % exprimé en glucose.

Après hydrolyse d'une suspension à 0,1 % de substrat dans l'acide chlorhydrique 2N à + 100°C pendant 4 heures, le taux des glucides réducteurs, dosés par la méthode de SOMOCYI (343), est de 9,13 %, exprimé en glucose.

Les hexosamines ont été dosées, en suivant le mode opératoire décrit par MONTREUIL et SCHEPPLER (245), après une hydrolyse dans l'acide chlorhydrique 6N à + 100°C, pendant 8 heures. Le taux trouvé est de 10 %, exprimé en glucosamine.

Nous avons dosé séparément les lipides non liés, directement extractibles par l'éther, et les lipides liés que nous avons isolés en suivant la technique décrite par WESTPHAL et coll. (403) pour l'obtention du lipide A. Dans ces conditions, le taux de lipides liés est de 10,7 %, et celui de lipides non liés est de 4,7 %. La fraction lipidique constitue donc, au total, 15,4 % du poids sec.

Les acides aminés ont été dosés, après hydrolyse dans l'acide chlorhydrique 6N à + 100°C, pendant 20 heures. En effectuant le dosage par la méthode de KEMBLE et MACPHERSON (187) on trouve un taux de 36,3 %, tandis que la méthode colorimétrique à la ninhydrine donne un taux aussi élevé que 54 %, exprimé en leucine.

Certains constituants ont été identifiés par chromatographie sur papier. Dans le cas des acides aminés, nous avons mis en évidence la présence de l'acide diaminopimélique, la lysine, l'alanine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, le glycofolle, la leucine et la sérine. ces deux derniers en quantité plus faible.

Comme hexosamines, nous n'avons trouvé que de la glucosamine et de l'acide muramique.

Nous n'avons pas pu identifier avec certitude les oses contenus dans le substrat du lysozyme. Il se forme une tache au niveau du glucose, mais on trouve également des traces de glucides au niveau du rhamnose, du mannose et du galactose. Ceci semble confirmer que cette fraction contient également des traces d'antigène somatique.

2. Composition de l'antigène somatique.

Pour l'analyse de cette fraction, nous avons utilisé exactement les mêmes méthodes. Les taux de constituants trouvés sont les

suivants : 5,94 % d'azote total; 2,11 % de phosphore total; 5,73 % d'hexosamines; 23,3 % de glucides réducteurs après hydrolyse, exprimé en glucose; 22,13 % d'oses totaux dosés à l'orcinol; 17,6 % d'oses totaux dosés à l'anthrone; 30,86 % d'acides aminés dosés par la Chloramine T; 46,2 % d'acides aminés dosés par la ninhydrine; 11,72 % de lipides non liés et 10,61 % de lipides liés, ce qui fait 22,33 % de lipides totaux. Nous n'y avons pas trouvé de baryum.

Les constituants ont été identifiés également par chromatographie sur papier. Nous avons ainsi pu mettre en évidence les acides aminés suivants : acide aspartique, acide glutamique, sérine, glycocolle, thréonine, alanine, valine et leucine.

Comme hexosamine, nous n'avons trouvé que de la glucosamine.

Quant aux oses non aminés identifiés, il s'agit du glucose, du mannose, du galactose et du rhamnose, déjà mis en évidence par plusieurs auteurs (349) dans le polyside spécifique d'*Eberthella typhi*.

L'examen du tableau comparatif des résultats analytiques des deux fractions (tableau 5), fait immédiatement apparaître que le constituant soluble, qui a l'antigénicité de l'antigène somatique en a également la composition chimique. On remarquera sa forte teneur en glucides totaux, par rapport à celle du substrat du lysozyme qui semble contenir uniquement des glucides aminés (*).

Mais, la différence est particulièrement expressive, quand on compare les compositions qualitatives des deux fractions. On remarque bien, dans le constituant soluble, tous les glucides identifiés par les auteurs dans l'antigène somatique complet d'*Eberthella typhi* 0-901, à l'exception du tyvélose que nous n'avons pas recherché spécialement. Tout au contraire, aucun de ces glucides, à l'exception de la glucosamine et peut-être du glucose, ne semble faire partie du substrat du lysozyme. En revanche, celui-ci contient de l'acide muramique, qui, comme il est connu, n'existe pas dans l'antigène somatique. Il en est de même pour l'acide diaminopimélique et la lysine, présents uniquement dans le substrat du lysozyme. D'ailleurs, le nombre des acides aminés rencontrés dans cette fraction se réduit pratiquement à quatre, alors qu'on en a identifié huit dans la fraction soluble.

(*) La présence de faibles quantités d'autres glucides est à discuter.

TABLEAU 5

Constituants dosés (grammes p. 100)	Fraction soluble = Antigène somatique	Fraction insoluble = Substrat du lysozyme
Baryum	0	11,3
Azote total	5,94	6,1
Phosphore total	2,11	0,49
Lipides totaux	22,33	15,4
Lipides non liés	10,61	10,7
Lipides liés	11,72	4,7
Acides aminés		
- par la chloramine T	30,86	36,3
- par la ninhydrine .	42,6	54,0
Glucides réducteurs .. (après hydrolyse)	23,3	9,13
Oses totaux		
- par l'orcinol	22,13	13,9
- par l'anthrone	17,6	7,9
Hexosamines	5,73	10
Constituants identifiés par chromatographie sur papier	glucose	glucose (?)
	mannose	0
	galactose	0
	rhamnose	0
	glucosamine	glucosamine
	0	acide muramique
	acide aspartique	acide aspartique
	acide glutamique	acide glutamique
	alanine	alanine
	glycocolle	glycocolle
	thréonine	0
	valine	0
	leucine	traces
	sérine	traces
	0	lysine
	0	acide diamino- pimélique

Par sa composition qualitative si particulière, la fraction glycopeptidique du substrat du lysozyme s'identifie, immédiatement et sans discussion, à l'élément fondamental de la structure pariétale (cf. p. 39), caractéristique de la couche interne de la paroi ectoplasmique.

CHAPITRE VII

DISCUSSION, ESSAI DE SYNTHESE. STRUCTURE DE LA PAROI ECTOPLASMIQUE D'EBERTHELLA TYPHI

Nos résultats d'analyse doivent être discutés en fonction de la solution apportée aux problèmes techniques majeurs, que constituent la préparation des parois isolées et la dissolution de leur texture. Nous avons fait appel à une digestion trypsique, à la suite de nombreux auteurs, avec la modalité d'un chauffage préalable des bactéries à -100°C pendant 10 minutes, dans des conditions bien normalisées. Nous avons discuté du risque qu'introduit cette dernière opération, en réalité indispensable pour que le second temps puisse être obtenu : celui de la dissolution de la texture des parois et de la dispersion de leurs éléments constitutifs, sous le simple effet de substances tensioactives; et ce résultat, très supérieur à celui des hydrolyses habituellement utilisées, compense, peut-être, les inconvénients que soulève *a priori* l'usage de ce chauffage ménagé.

En réalité, seuls les résultats analytiques, dans la mesure où ils éclairent et complètent les connaissances déjà acquises, permettent de juger de la valeur du procédé original que nous avons mis en œuvre. Il y a là une véritable pétition de principe, malheureusement inévitable, puisque l'on prétend juger de la valeur d'une méthode en fonction des résultats acquis par d'autres méthodes dont on ignore la valeur.

Il résulte, pour l'essentiel de notre travail, que nous avons isolé des parois d'*Eberthella typhi*, deux ensembles complexes de nature glucido-lipido-protéique précipitables par le baryum, l'un d'eux repassant en solution quand on chélate cet ion par l'E.D.T.A. tétrasodique (nous le désignerons par la lettre A), l'autre insensible à ce traitement et demeurant insoluble (nous le désignerons par la lettre S).

Injecté aux lapins par voie intraveineuse, le produit A, très toxique, provoque, à la dose de 1 μ g, la réaction hyperthermique caractéristique de l'endotoxine, alors que le produit S n'est pas toxique. Une seule injection intraveineuse de 1 μ g du produit A suffit à faire apparaître en quelques jours, dans le sang des lapins, des taux décelables d'anticorps de type 0, agglutinant *Eberthella typhi* 0-901. En revanche, il est nécessaire d'injecter des doses beaucoup plus importantes (de l'ordre de 1 mg et de façon répétée) pour faire apparaître des anticorps analogues avec le produit S.

Au point de vue chimique, les deux produits contiennent une fraction lipidique, une fraction glucidique et une fraction polypeptidique. Nous n'avons pas, jusqu'à présent, cherché à identifier les constituants de la fraction lipidique. L'analyse de la fraction glucidique, après hydrolyse, a révélé l'existence dans le produit A, de glucosamine, de glucose, de galactose, de mannose, et de rhamnose, ces quatre derniers étant caractéristiques des groupements antigéniques IX et XII (349, 351). En revanche, aucun de ces oses — sauf peut-être le glucose — ne se retrouve dans le complexe S; mais celui-ci contient, à côté de la glucosamine, de l'acide muramique qu'on ne rencontre pas dans le complexe A. Les fractions polypeptidiques se montrent également différentes dans les deux produits; notamment, le complexe S contient de la lysine et de l'acide diaminopimélique, qui ne se retrouvent pas dans le complexe A. Dès lors, il est facile d'identifier le complexe A à l'endotoxine, à l'antigène somatique complet de la bactérie; tandis que l'on retrouve dans le complexe S, le glycopeptide que Miss WORK (419) appelle « le constituant fondamental de la structure pariétale ». Quant à la fraction insoluble, riche en lipides, extraite directement par le Teepol (cf. p. 110), elle paraît bien correspondre au lipide faiblement lié, appelé lipide B par WESTPHAL et coll. (403, 404).

Ces résultats ont donc le mérite de s'intégrer facilement dans les connaissances acquises, selon lesquelles la paroi serait essentiellement constituée de deux couches; l'une, externe, facilement solubilisée par l'acide trichloracétique, le phénol et le diéthylène-glycol

anhydre, contiendrait l'antigène somatique et un lipide non lié; l'autre, profonde, formerait la trame rigide de la paroi caractérisée, au point de la composition chimique, par le glycopeptide de Miss WORK. Manifestement, la fraction soluble que nous avons isolée (complexe A), correspond à la couche externe; et la fraction insoluble (complexe S), à la couche profonde. Or, il se trouve, comme on pouvait s'y attendre, que cette dernière fraction, hydrolysable par le lysozyme, constitue l'unique substrat de l'enzyme; la fraction A, c'est-à-dire l'antigène somatique, n'étant nullement modifiée par ce dernier. D'autre part, il est remarquable et inattendu que le constituant fondamental de la structure pariétale, qui n'est donc pas autre chose que le substrat du lysozyme, se trouve fermement lié à un constituant lipidique.

Ces conclusions, parfaitement en accord avec l'ensemble des connaissances acquises jusqu'à maintenant, ne cadrent cependant pas avec celles de WEIDEL, qui, avec de nombreux collaborateurs, a consacré d'importants travaux à l'étude la structure de la paroi d'*Escherichia coli* (193, 390 à 393).

WEIDEL distingue bien, lui aussi, deux couches dans la paroi. La couche externe, qu'il appelle « couche lipoprotéique », ne contiendrait pas de glucides; ceux-ci ne se rencontrant que dans la couche interne, qu'il appelle « couche lipopolyosidique » (*) (391). Ces résultats, tout à fait en opposition avec ceux des autres auteurs, appellent, *a priori*, quelque suspicion sur la méthode suivie par WEIDEL pour isoler les parois ectoplasmiques. Celle-ci consiste en une trypsination des bactéries, préalablement soumises à une autolyse profonde sous toluène et avec oxygénation constante (390). On conçoit qu'un tel procédé, très long et difficile à normaliser, puisse entraîner des altérations, peut-être de nature enzymatique, de certains constituants pariétaux.

Plusieurs arguments permettent d'étayer solidement cette hypothèse. WEIDEL identifie les divers constituants de la paroi, par leurs propriétés réceptrices vis-à-vis des phages de la série T. Or, il observe, qu'au contraire des bactéries intactes, les parois qu'il a isolées ont perdu la propriété de fixer les phages T₁ et T₅ (390). Cet auteur a d'ailleurs isolé lui-même les récepteurs de T₅, en traitant les bactéries intactes par une solution diluée de soude (391 bis). Il a montré qu'il s'agit d'un complexe glucido-lipido-

(*) Cette dénomination nous paraît impropre, étant donné que cette fraction contient également un constituant peptidique. Elle est d'autre part ambiguë, car le terme « lipopolyoside » désigne, en général, le complexe glucido-lipidique obtenu à partir de l'antigène O complet.

protéique contenant 16,5 % de glucides réducteurs non aminés, dont en particulier un heptose, 7,7 % d'hexosamines et 34 % de lipides (391 bis). Il apparaît donc que les parois préparées par trypsination après autolyse, ont perdu ce récepteur riche en glucides.

D'autre part, les observations de WESTPHAL et col. (214, 399), prouvent également que les bactéries intactes comportent à leur surface un lipopolyoside antigénique, extractible par le phénol, qui n'existe pas sur les parois isolées par la méthode de WEIDEL. La fraction glucidique de ce complexe, isolé à partir d'*Escherichia coli*, contient des hexosamines, du galactose, du glucose, du mannose, du xylose, du rhamnose et une petite quantité d'heptose (214, 403. 404). Il paraît donc certain que les parois obtenues après autolyse, diffèrent des parois intactes, notamment par la disparition d'un constituant glucidique.

WEIDEL ne semble pas avoir soupçonné les inconvénients de sa méthode de préparation des parois, bien qu'il ait éprouvé des difficultés à interpréter les résultats de ses analyses. Reconnaisant que le récepteur de T₅ est un constituant superficiel et que celui-ci n'existe plus dans les parois isolées sur lesquelles il a travaillé, il est amené à distinguer la « membrane cellulaire » (Zell-Membran). de la « paroi cellulaire » (Zell-Wand). Cette dernière serait constituée de la première, recouverte extérieurement du récepteur de T₅. La « membrane cellulaire » s'identifie, pour lui, à la paroi telle qu'il l'obtient par son procédé de préparation (391 bis).

L'examen des résultats obtenus par WEIDEL et coll., dans l'analyse de la couche profonde des parois (couche lipopolyosidique), appelle également un certain nombre de remarques. WEIDEL a trouvé que cette couche interne contient les récepteurs des phages T₃, T₄ et T₇, récepteurs constitués par un complexe glucido-lipidique libérant à l'hydrolyse du glucose et un heptose (393). L'auteur a observé que ces récepteurs sont tout à fait différents du glycopeptide hydrolysable par l'enzyme des phages (193), et qui se trouve également contenu dans cette couche interne (393). Il se représente donc cette dernière comme formée d'îlots constitués par les récepteurs glucido-lipidiques des phages T₃, T₄ et T₇, reliés, par l'intermédiaire de ponts glucosidiques, au glycopeptide substrat de l'enzyme des phages (393).

« Etant donné que l'enzyme du phage, non seulement rompt les ponts, mais semble les supprimer complètement, on peut supposer qu'ils possèdent les mêmes groupements fonctionnels aux deux extrémités. Dans le cas contraire, on se verrait dans l'obligation d'accorder à l'enzyme deux spécificités différentes, ce qui paraît improbable » (393).

Cette hypothèse cadrerait bien avec ce que l'on sait de la spécificité de l'enzyme des phages, qui paraît être un lysozyme (194), c'est-à-dire, probablement, une β 1-4 glucosaminidase.

Comme le phage T_4 , dont le récepteur appartient à la couche interne de la paroi, est directement absorbable par les bactéries intactes recouvertes de la couche « lipoprotéique » externe, au contraire des phages T_3 et T_7 qui ne le sont pas, WEIDEL suppose que la couche « lipoprotéique » externe est poreuse, permettant au phage d'entrer en contact avec son récepteur (391 bis). En réalité, cette hypothèse ne nous paraît pas nécessaire, puisque la couche interne et la couche externe contiennent toutes les deux un heptose, qui semble constituer justement le récepteur de T_4 . D'autre part, si la couche externe était poreuse, il est probable que les phages T_3 et T_7 , dont les récepteurs se situent également dans la couche interne (391), seraient absorbés directement, alors qu'il n'en est rien.

La difficulté d'arriver à une interprétation d'ensemble, à cause des résultats divergents de WEIDEL et coll., nous paraît surmontable, étant donné que la couche externe « lipoprotéique » de ces auteurs ne représente, sans aucun doute, qu'une fraction du complexe glucido-lipido-protéique endotoxique. Cela montre combien les résultats dépendent du procédé de préparation des parois mis en œuvre.

Nous avons tenté de résumer l'ensemble des données acquises, dans un schéma de la structure de la paroi ectoplasmique.

On peut se représenter la membrane cytoplasmique comme la limite de séparation entre la phase protoplasmique et le milieu extérieur. Il est vraisemblable que celle-ci est constituée de molécules orientées de telle manière que la tension superficielle soit minimum; les lipides s'y accumulent donc et les groupements hydrophobes tendent à s'orienter vers la surface (*). Pour que le même principe soit respecté, il est logique de penser que les lipides de la couche interne de la paroi ectoplasmique (substrat du lysozyme) doivent se trouver en contact avec la membrane cytoplasmique. Pour la même raison encore, on peut s'attendre à ce

(*) Des tentatives récentes d'identification des constituants de la membrane cytoplasmique des bactéries, appuient l'existence d'une couche protéique tout à fait extérieure (77, 108). Malheureusement, ces analyses ont été réalisées sur des « fantômes » obtenus par l'action du lysozyme sur *Micrococcus lysodeikticus*; il est très probable que ces « fantômes » ne représentent pas la membrane cytoplasmique dans son état naturel; le lysozyme, en particulier y demeure fixé et il n'est pas possible de le détacher sans détruire les « fantômes » (56, 61).

que les lipides de la couche externe de la paroi (antigène somatique) se trouvent en contact avec les lipides de la couche interne.

Mais la rigidité de la paroi et la cohésion mécanique de celle-ci sont liées au « constituant fondamental », c'est-à-dire au glycopeptide de la couche interne. Nous avons trouvé d'autre part, que ce dernier est solidement fixé au lipide. On est ainsi conduit à admettre que le constituant glycopeptidique forme un réseau de mailles isolant des îlots de nature lipidique.

S'il en est ainsi, il est naturel de penser que la fraction polypeptidique du constituant externe entre en contact, sinon en combinaison, avec la fraction de même nature du constituant interne. Il paraît d'autre part démontré, que ce polypeptide de la couche externe occupe une position tout à fait superficielle. En effet, d'après WEIDEL et coll. (391, 393), les récepteurs des phages T_2 et T_6 , qui se situent dans ce polypeptide, sont directement accessibles aux phages dans la bactérie intacte. KRÖGER (197) a montré enfin, que ce polypeptide injecté au lapin, provoque la formation d'anticorps, qui peuvent se fixer en totalité sur les bactéries intactes homologues; ce qui ne paraît possible que si le polypeptide se trouve à la surface des bactéries.

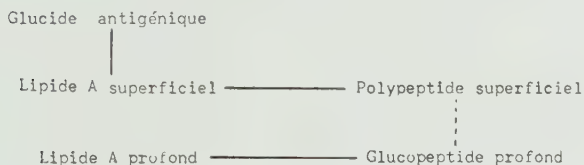
Quant aux polyosides antigéniques spécifiques, fortement hydrophiles, il convient de leur attribuer une situation superficielle, en accord avec la plupart des auteurs. Mlle STAUB (351) a établi que le chaînon glucidique terminal de l'antigène IX est : tyvélose-mannose-mannose; alors que l'antigène XII, ramifié, comporterait le rhamnose et le glucose comme oses terminaux. On sait d'autre part, que la fraction polyosidique est liée au lipide par l'intermédiaire de la glucosamine, alors que ce dernier est lié au peptide par l'intermédiaire d'un acide aminé dicarboxylique (403, 404).

Nous avons groupé ces données dans le schéma de la page 127 et dans la coupe de la paroi, plus figurative, où nous avons représenté le lipide B, non lié, en position externe.

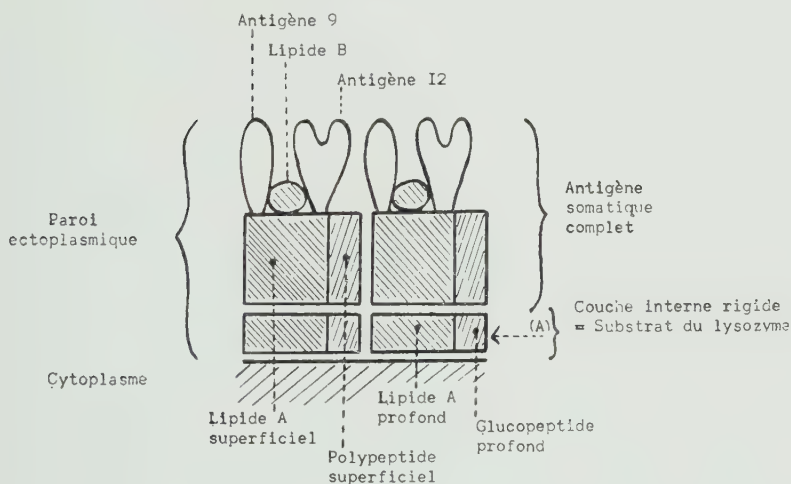
On est encore réduit aux hypothèses, quant à la nature des liens existant entre les constituants de la couche externe et ceux de la couche interne de la paroi. Peut-être s'agit-il simplement d'une solvation réciproque, d'affinité de surface entre éléments homologues, ce qui permettrait de comprendre l'extrême facilité avec laquelle se libère, partiellement ou totalement, l'endotoxine superficielle. Peut-être s'agit-il de liaisons hydrogènes, facilement dissolubles par les solvants très polaires ou par l'urée. Mais peut-être aussi se trouvent impliqués, bien que cela paraisse moins probable, de véritables liaisons de covalence, établies, par exemple, entre le

polypeptide superficiel et la glycopeptide profond, par le truchement de restes d'acide diaminopimélique qui demeurent aptes à constituer des ponts peptidiques.

REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE PARIETALE



COUPE TRANSVERSALE d'*Eberthella typhi* O-90I



COUPE LONGITUDINALE DE LA COUCHE INTERNE SUIVANT (A)



CONCLUSIONS

Les parois ectoplasmiques d'*Eberthella typhi* souche 0-901, sont préparées par digestion trypsique des bactéries coagulées par la chaleur. L'usage d'alcoylsulfates secondaires (solution commerciale de *Teepol*) permet de dissocier la texture de ces parois. L'addition de chlorure de baryum précipite deux complexes de nature glucido-lipido-protéique. La chélation du baryum par l'acide éthylène-diamine-tétracétique permet de remettre en solution l'un d'entre eux et de le séparer de l'autre qui demeure insoluble.

Les propriétés biologiques et la constitution chimique du complexe soluble, permettent de l'identifier à l'antigène somatique O (endotoxine) et partant, à la couche externe de la paroi ectoplasmique. Le complexe insoluble comporte une fraction lipidique et une fraction glycopeptidique, dont la composition est celle du « constituant fondamental de la structure pariétale », support des propriétés mécaniques de la paroi et notamment de la rigidité. Ce glycopeptide, solidement lié au lipide, forme la couche interne de la paroi et paraît être le seul constituant hydrolysable par le lysozyme.

Des considérations théoriques permettent de tenter de reconstituer la structure de la paroi à partir de ces éléments. La fraction lipidique du substrat du lysozyme serait en contact avec la membrane cytoplasmique et maintenue en place par un réseau de mailles rigide, constitué de la fraction glycopeptidique de la couche profonde, riche en hexosamines et en acide diaminopimélique. Le lipide de l'antigène somatique constituant la couche externe de la paroi, viendrait en contact avec le lipide de la couche profonde, sa fraction protéique entrant en liaison avec le glycopeptide profond, les chaînons osidiques hydrophiles constituant les antigènes IX et XII, se trouvant tournés vers le milieu extérieur.

Le lipide non lié occuperait une position superficielle, sans doute en rapport avec le lipide lié du complexe endotoxique (antigène somatique). Cette structure tient compte de l'ensemble des connaissances acquises sur la paroi, non seulement par l'analyse antigénique et l'analyse chimique, mais encore par l'étude de l'action des détergents, de la pénicilline, des bactériophages et du lysozyme.

Vu, *le Doyen*,
H HERMANN.

Le Président de la Thèse,
R. SOHIER.

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 8 juin 1960.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
A. ALLIX.

BIBLIOGRAPHIE

1. ADAIR (G.S.). — Disc. Farad. Soc., 1956, 21, 285.
2. ALDERTON (G.), WARD (B.H.) et FEVOLD (H.L.). — J. Biol. Chem., 1945, 157, 43.
3. AMINOFF (D.), MORGAN (W.T.J.) et WATKIN (W.M.). — Biochem J., 1950, 46, 426.
4. ANDERSON (T.F.). — J. Cell. Comp. Physiol., 1945, 25, 1.
5. ANDERSON (T.F.), RHODES (R.A.), NELSON (G.E.N.), SHEKLETON (M.C.), BARRETO (A. Jr.) et ARNOLD (M.). — J. Bact., 1958, 76, 131.
6. ANDO (K.) et NAKAMURA (Y.). — Jap. J. Exptl. Med., 1950, 21, 41.
7. ARDENNE (M. von). — Angew. Chem., 1941, 54, 144.
8. ASHWELL (G.), in COLOWICK (S.P.) et KAPLAN (N.O.). — Methods in Enzymology, 1957, 3, 73.
9. ASSELINEAU (J.) et LEDERER (E.). — C.R. Soc. Biol., 1950, 230, 142.
10. AVERY (O.T.) et CULLEN (G.E.). — J. Exptl. Med., 1920, 32, 583.
- 10 bis. ARMSTRONG (J.J.), BADDILEY (J.), BUCHANAN (J.B.), CARSS (B.) et GREENBERG (G.R.). — J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 4.344.
11. BAKER (E.E.), GOEBEL (W.F.) et PERLMAN (E.). — J. Exptl. Med., 1949, 89, 325.
12. BAKER (R.F.) et PEASE (D.C.). — Nature, 1949, 163, 282.
13. BAKER (Z.), HARRISON (R.W.) et MILLER (B.F.). — J. Exptl. Med., 1941, 73, 249.
14. BAKER (Z.), HARRISON (R.W.) et MILLER (B.F.). — J. Exptl. Med., 1941, 74, 611.
15. BARNARD (I.E.) et HEWLETT (R.T.). — Proc. Roy. Soc. B., 1911, 84, 57.
16. BARRY (G.T.). — Nature, 1959, 183, 117.
17. BARTHOLOMEW (J.W.) et UMBREIT (W.W.). — J. Bact., 1944, 48, 567.
18. BARTHOLOMEW (J.W.) et MITTWER (T.). — Bact. Rev., 1952, 16, 1.
19. BELCHER (R.), NUTTEN (A.J.) et SAMBROOK (C.M.). — The Analyst, 1954, 79, 201.
20. BENIANS (T.H.C.). — J. Pathol. Bact., 1920, 23, 401.

21. BERGER (L.R.) et WEISER (R.S.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 26, 517.
22. BERTRAB. — Cité par Tomcsik et Baumann-Grace (378).
23. BHATNAGAR (S.S.), SPEECHLY (C.G.) et SINGH (M.). — *J. Hyg. (Lond.)*, 1938, 38, 663.
24. BINKLEY (F.), GOEBEL (W.F.) et PERLMAN (E.). — *J. Exptl. Med.*, 1945, 81, 331.
25. BLASS (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, 40, 1003.
26. BLOCK (R.J.), DURRUM (E.L.) et SWEIG (G.). — *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*. Academic Press. Inc., New-York, 1958, p. 181.
27. BOAS (N.F.). — *J. Biol. Chem.*, 1953, 204, 553.
28. BOIVIN (A.), MESROBEANU (I.) et MESROBEANU (L.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1933, 113, 490.
29. BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.). — *Rev. Immunol.*, 1935, 1, 553.
30. BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.). — *Rev. Immunol.*, 1936, 2, 113.
31. BOIVIN (A.). — *Exposés Annuels de Biochimie Médicale*, Masson et Cie, Paris, 1947, 7, 63.
32. BOLLE (A.) et MIRIMANOFF (A.). — *J. Pharm. and Pharmacol.*, 1951, 2, 685.
33. BOLLE (A.) et KELLENBERGER (E.). — *Pharm. Acta Helv.*, 1958, 33, 379.
34. BOOTH (V.H.) et GRENN (D.E.). — *Biochem. J.*, 1938, 32, 855.
35. BOSCO (G.). — *J. Infect. Dis.*, 1956, 99, 270.
36. BOUCHARDY (M.) et MIRIMANOFF (A.). — *Pharm. Acta Helv.*, 1951, 26, 69 et 284.
37. BOULANGER (P.), BIZERTE (G.) et COURTOT (F.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1952, 34, 366.
38. BOURILLON (R.) et MICHON (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, 41, 267.
39. BRAUN (O.M.). — VIII^e Congr. Ass. int. Pediat. Abstract n° 107, Lecture n° 197. Cité par Westphal (404).
40. BRENNER (S.), DARK (F.A.), GERHARDT (P.), JEYNES (M.H.), KANDLER (O.), KELLENBERGER-NOBEL (E.), MAC QUILLEN (K.), RIBIO-HUERTOS (M.), SALTON (M.R.J.), STRANGE (R.E.), TOMCSIK (J.) et WEIBULL (C.). — *Nature*, 1958, 181, 1713.
41. BRUDNY (V.). — *Zbl. Bakt. IIte Abt.*, 1908, 21, 62.
42. BÜCHNER (E.). — *Ber. dent. Chem. Ges.*, 1897, 30, 117 et 1110. Cité par Hugo (162).
43. BURDON (K.L.). — *J. Bact.*, 1946, 52, 665.
44. CALIFANO (L.). — *Rend. Accad. Lincei Ser.*, 1950, 142, 8.
45. CAPUTO (A.). — *Experientia*, 1955, 11, 400.
46. CARLSON (W.W.), ROSARIO (C.L.) et WHITESIDE-CARLSON (V.). — *J. Bact.* 1953, 65, 136. Cité par Hugo (162).
47. CHAMBERS (L.A.) et FLOSDORF (E.W.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1936, 34, 631.
48. CHAMBERS (L.A.) et GAINES (N.). — *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1932, 1, 451.

49. CHAPMAN (G.B.). — J. Bact., 1959, 78, 96.
50. CMELIK (S.). — Biochem. Z., 1952, 322, 456.
51. CMELIK (S.). — Hoppe Seyl. Z. Physiol. Chem., 1952, 289, 78.
52. CMELIK (S.). — Hoppe Seyl. Z. Physiol. Chem., 1952, 290, 146.
53. CMELIK (S.). — Hoppe Seyl. Z. Physiol. Chem., 1953, 293, 222.
- 53 bis. COHEN (P.P.). — J. Biol. Chem., 1940, 136, 565.
54. COLOBERT (L.). — Thèse Sciences. Paris, 1955, n° 3728.
55. COLOBERT (L.). — Bull. Soc. Chim. Biol., 1957, 39, Sup. 1, 135.
56. COLOBERT (L.). — C.R. Soc. Biol. Fr., 1957, 151, 114.
57. COLOBERT (L.). — C.R. Soc. Biol. Fr., 1957, 151, 1553.
58. COLOBERT (L.). — C.R. Acad. Sci. Fr., 1957, 244, 2863.
59. COLOBERT (L.). — C.R. Acad. Sci. Fr., 1957, 245, 1674.
60. COLOBERT (L.). — Ann. Inst. Pasteur, 1958, 95, 156.
61. COLOBERT (L.). — C.R. VII^e Cong. Intern. Microbol., Stockholm, 1958, 419.
62. COLOBERT (L.). — Bull. Soc. Pharm. Marseille, 1958, 28, 7.
63. COLOBERT (L.) et LOUISOT (P.). — Ann. Inst. Pasteur, 1958, 94, 463.
64. COLOBERT (L.) et SERVANT (P.). — Ann. Inst. Pasteur, 1959, 97, 549.
65. COLOBERT (L.). — Pathologie et Biologie, 1960, 8, 1023.
66. COLOBERT (L.) et CREACH (O.). — Biochim. Biophys. Acta, 1960, 40, 167.
67. COLOBERT (L.) et DIRHEIMER (G.). — C.R. Acad. Sci. Fr., 1960, 250, 423.
68. CRUMPTON (M.J.) et DAVIES (D.A.L.). — Biochem. J., 1958, 70, 729.
69. CRUMPTON (M.J.). — Biochem. J., 1959, 72, 479.
71. CUMMINS (C.S.). — Int. Rev. Cytol., 1956, 5, 25.
72. CUMMINS (C.S.) et HARRIS (H.). — J. gen. Microbiol., 1956, 14, 583.
73. CUMMINS (C.S.), GLENDENNING (O.M.) et HARRIS (H.). — Nature, 1957, 180, 337.
74. CURRAN (H.R.) et EVANS (F.R.). — J. Bact., 1942, 43, 125.
75. CZARNETZKY (E.J.). — Science, 1936, 84, 355.
76. DA-CHEN (W.) et MANN (W.). — Acta Physiol. Sinica, 1957, 21, 80.
77. DANIELLI (J.F.). — Cytology and Cell Physiology. Bourne ed. O.U.P. Oxford, 1951, p. 150.
78. DAVIES (D.A.L.) et MORGAN (W.T.J.). — VI^e Congr. Intern. Microbiol. Rome, 1953, 2, 16.
79. DAVIES (D.A.L.), MORGAN (W.T.J.) et MOSIMANN (W.). — Biochem. J., 1954, 56, 572.
80. DAVIES (D.A.L.). — Biochem. J., 1955, 59, 696.
81. DAVIES (D.A.L.), MORGAN (W.T.J.) et RECORD (B.R.). — Biochem. J., 1955, 60, 220.
82. DAVIES (D.A.L.). — Biochim. Biophys. Acta, 1957, 26, 151.
83. DAVIES (D.A.L.), STAUB (A.M.), FROMME (I.), LÜDERITZ (O.) et WEST-PHAL (O.). — Nature, 1958, 181, 222.

84. DAVIES (J.T.), HAYDEN (D.A.) et RIDEAL (E.). — Proc. Roy. Soc. B., 1956, *143*, 375.
85. DAVIES (R.). — Biochim. Biophys. Acta, 1959, *33*, 481.
86. DAWSON (I.M.) et STERN (H.). — Biochim. Biophys. Acta, 1954, *13*, 31.
87. DE (M.L.) et SADHUKHAN (P.). — Nature, 1958, *182*, 1008.
88. DEUSSEN (E.). — Z. Hyg. Infektr., 1918, *85*, 235.
89. DEWEY (D.L.) et WORK (E.). — Nature, 1952, *169*, 533.
90. DISCHE (Z.) in GLICK (D.). — Methods of Biochemical Analysis, 1955, *2*, 313.
91. DOCKSTADER (W.B.) et HALVORSON (H.O.). — Science, 1950, *112*, 618. Cité par Hugo (162).
92. DOMAGK (G.). — Deutschen Med. Wschr., 1935, *61*, 829. Cité par Schulman (333).
93. DORFMAN (A.) et CIFONELLI (J.A.). — Ciba Found. Symp. on Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides, J. et A. Churchill, Londres, 1958, p. 157.
94. DREYER (G.), SCOTT (S.G.) et WALKER (E.W.A.). — J. Path. Bact., 1911, *16*, 146.
95. DUBOS (R.J.) et AVERY (O.T.). — J. Exptl. Med., 1931, *54*, 51.
96. DUBOS (R.J.). — J. Exptl. Med., 1937, *65*, 873.
97. DUBOS (R.J.). — « The Bacterial Cell. » Harvard University Press, 1945.
98. DUBOS (R.J.) et SCHAEGLER (R.W.). — J. Exptl. Med., 1956, *104*, 53.
99. DUBOS (R.J.), SCHAEGLER (R.W.) et BOEHME (D.). — Fed. Proc., 1957, *16*, 1879 S.
100. DUGUID (J.B.) et WILKINSON (J.F.). — J. gen. Microbiol., 1953, *9*, 174.
101. DYAR (M.T.) et ORDAL (E.J.). — J. Bact., 1946, *51*, 149.
102. DYAR (M.T.). — J. Bact., 1947, *53*, 498.
103. EISENBERG (P.). — Zbl. Bakt. 1909, *49*, 465.
104. ELSON (L.A.) et MORGAN (W.T.J.). — Biochem. J., 1933, *27*, 1820.
105. EPSTEIN (L.A.) et CHAIN (E.). — Brit. J. Exp. Path., 1940, *21*, 339.
106. FAURE (M.) in LOISELEUR (J.). — Techniques de Laboratoire, Masson et Cie, Paris, 1954, *1*, 715.
107. FELIX (A.). — J. Hyg. (Lond.), 1952, *50*, 558. Cité par Wilson et Miles (412).
108. FEW (A.V.), GILBY (A.R.) et SEAMAN (G.V.F.). — Biochim. Biophys. Acta, 1960, *38*, 130.
109. FISKE (C.M.) et SUBBAROW (Y.). — J. Biol. Chem., 1925, *66*, 375.
110. FLEMING (A.). — Proc. Roy. Soc. B., 1922, *93*, 306.
111. FLEMING (A.) et ALLISON (V.D.). — Brit. J. Exp. Path., 1922, *3*, 252.
112. FOUQUEY (C.), POLONSKY (J.) et LEDERER (E.). — Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, *40*, 315.
113. FREEMAN (G.G.), CHALLINOR (S.W.) et WILSON (J.). — Biochem. J., 1940, *34*, 307.

114. FREEMAN (G.G.) et ANDERSON (T.H.). — *Biochem. J.*, 1941, 35, 564.
115. FREEMAN (G.G.), — *Biochem. J.*, 1942, 36, 340.
116. FREEMAN (G.G.). — *Biochem. J.*, 1943, 37, 601.
117. FROMME (I.), LÜDERITZ (O.) et WESTPHAL (O.). — *Z. Naturforsch.*, 1954, 9 b, 303.
118. FROMME (I.), LÜDERITZ (O.), NOWOTNY (A.) et WESTPHAL (O.). — *Pharm. Acta Helv.*, 1958, 33, 391.
119. GARDELL (S.) in GLICK (D.). — *Methods of Biochemical Analysis*, 1958, 6, 289.
120. GENDRE (T.) et LEDERER (E.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, 8, 49.
121. GEST (H.) et GIBBS (M.). — *J. Bact.*, 1952, 63, 661. Cité par Hugo (162).
122. GILBY (A.R.), FEW (A.W.) et MAC QUILLEN (K.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, 29, 21.
123. GLADSTONE (G.P.) et JOHNSTON (H.H.). — *Brit. J. Exp. Path.*, 1955, 36, 363.
124. GLASSMAN (H.N.). — *Bact. Rev.*, 1948, 12, 105.
125. GLEGG (R.E.) et EIDINGER (D.). — *Anal. Chem.*, 1954, 26, 1365.
126. GOEBEL (W.F.), BINKLEY (F.) et PERLMAN (E.). — *J. Exptl. Med.*, 1945, 81, 315.
127. GOEBEL (W.F.), BINKLEY (F.) et PERLMAN (E.). — *J. Exptl. Med.*, 1945, 81, 349.
128. GOEBEL (W.F.) et JESAITIS (M.A.). — *J. Exptl. Med.*, 1952, 96, 425.
129. GOLDMAN (D.E.) et LEPESHCKIN (W.W.). — *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1952, 40, 255.
130. GOODMAN (J.W.) et KABAT (E.A.). — *Fed. Proc.*, 1957, 16, 415.
131. GORBACH et HOFFMAN. — Cités par Tomcsik et Baumann-Grace (378).
132. GRAM (C.). — *Fortschr. Med.*, 1884, 2, 185.
133. GRATIA (A.) et LINZ (R.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1931, 108, 427.
134. GROSSBARD (E.) et PRESTON (R.D.). — *J. gen. Microbiol.*, 1956, 15, XI.
135. GROSSBARD (E.) et PRESTON (R.D.). — *Nature*, 1957, 179, 448.
136. GRULA (E.A.) et HARTSEL (S.E.). — *Bact. Proc.*, 1955, p. 33.
137. HAHN (F.E.) et CIAK (J.). — *Science*, 1957, 125, 119.
138. HALLANER (G.). — *Zentralb. f. Bakt.*, 1929, 114, 519.
139. HALPERN (B.N.) in LOISELEUR (J.). — *Techniques de Laboratoire*, Masson et Cie, Paris, 1954, 1, 865.
140. HARFENIST (E.J.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 5528.
141. HARTMAN (T.L.). — *Stain. Technol.*, 1940, 15, 23.
142. HARTSELL (S.E.). — 1^{er} Symp. Intern. sur Lysozyme de FLEMING Milan 1959.
143. HARVEY (E.N.) et LOOMIS (A.L.). — *J. Bact.*, 1929, 17, 373. Cité par Hugo (162).
144. HAYASHI (J.A.) et BARKULIS (S.S.). — *J. Bact.*, 1959, 77, 177.
145. HEDEN (C.G.) et WICKOFF (R.W.G.). — *J. Bact.*, 1949, 58, 153.
146. HEIDELBERGER (M.), MAC LEOD (C.M.), KAYSER (S.J.) et ROBINSON (B.). — *J. Exptl. Med.*, 1946, 83, 303.

147. HEIDELBERGER (M.). — *Ann. Rev. Biochem.*, 1956, 25, 641.
148. HEIDELBERGER (M.). — *J. Immunol.*, 1957, 78, 419, 427 et 431.
149. HEIDELBERGER (M.), BARKER (S.A.) et BJÖRKLUND (B.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 113.
150. HENRY (H.) et STACEY (M.). — *Nature*, 1943, 151, 671.
151. HENRY (H.) et STACEY (M.). — *Proc. Roy. Soc. B.*, 1946, 133, 391.
152. HIRS (C.H.W.), STEIN (W.H.) et MOORE (S.). — *J. Biol. Chem.*, 1954, 211, 941.
153. HOARE (D.S.). — *Biochem. J.*, 1955, 59, XXII.
154. HOARE (D.S.) et WORK (E.). — *Biochem. J.*, 1955, 60, II.
155. HOARE (D.S.) et WORK (E.). — *Biochem. J.*, 1955, 61, 562.
156. HOCHSTER (R.M.) et WATSON (R.W.). — *Nature*, 1952, 170, 357.
Cité par Hugo (162).
157. HOTCHKISS (R.D.). — *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1947, 66, 479.
158. HOTCHKISS (R.D.). — *Arch. Biochem.*, 1948, 16, 131.
159. HOUWINK (A.L.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, 10, 360.
160. HOWARD (J.G.), ROWLEY (D.) et WARDLAW (A.C.). — *Nature*, 1957, 179, 314.
161. HUGUES (D.E.). — *Brit. J. Exp. Path.*, 1951, 32, 97.
162. HUGO (W.B.). — *Bact. Rev.*, 1954, 18, 87.
163. HURST (H.J.). — *Exp. Biol.*, 1952, 29, 30.
164. IKAWA (M.), KOEPFLI (J.B.), MUDD (S.G.) et NIEMANN (C.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 1035.
165. IKAWA (M.), KOEPFLI (J.B.), MUDD (S.G.) et NIEMANN (C.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 3439.
166. IKAWA (M.) et O'BARR (J.S.). — *J. Biol. Chem.*, 1955, 213, 877.
167. IKAWA (M.) et SNELL (E.E.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 19, 576.
168. INGRAM (V.M.) et SALTON (M.R.J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 24, 9.
169. ISHIMOTO (N.), SAITO (M.) et ITO (E.). — *Nature*, 1958, 182, 959.
170. JESAITIS (M.A.) et GOEBEL (W.F.). — *J. Exptl. Med.*, 1952, 96, 409.
171. JOHNSON (A.G.), GAINES (S.) et LANDY (M.). — *J. Exptl. Med.*, 1956, 103, 225.
172. JOHNSON (C.H.). — *J. Physiol.*, 1929, 67, 356.
173. JOHNSON (F.H.). — *J. Bact.*, 1944, 47, 551.
174. JONES (A.S.), RIZVI (S.B.H.) et STACEY (M.). — *J. gen. Microbiol.*, 1958, 18, 597.
175. KABAT (E.A.) et BERG (D.). — *J. Immunol.*, 1953, 70, 514.
176. KABAT (E.A.). — *Rev. Hematol.*, 1957, 12, 606.
177. KABAT (E.A.). — *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1957, 50, suppl. 1, 79.
178. KABAT (E.A.). — *Ciba Symp. on Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides* J. et A. Churchill. Londres, 1958, p. 42.
179. KANDLER (O.) et ZEHENDER (C.). — *Z. Naturforsch.*, 1957, 12 b, 725.
180. KANDLER (O.), HUND (A.) et ZEHENDER (C.). — *Nature*, 1958, 181, 572.

181. KANDLER (O.), HUND (A.) et ZEHENDER (C.). — Arch. Mikrobiol., 1958, 30, 355.
182. KANTOROWICZ (A.). — Münch. Med. Wochschr., 1909, 146, 1268.
183. KAPLAN (M.L.) et KAPLAN (L.). — J. Bact., 1933, 25, 309.
184. KARUSH (F.). — Trans. N.Y. Acad. Sci., Sect. II, 1958, 20, 481.
185. KAUFFMANN (F.). — Acta path. Microbiol. Scand., 1947, 21, 20. Cité par Wilson et Miles (412).
186. KELLENBERGER (E.) et RYTER (A.). — J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1958, 4, 323.
187. KEMBLE (A.R.) et MACPHERSON (H.T.). — Biochem. J., 1954, 56, 548.
188. KENT (L.H.). — Biochem. J., 1957, 67, 5 P.
189. KICKHÖFEN (B.) et WESTPHAL (O.). — Z. Naturforsch., 1952, 7 b, 655.
190. KING (H.K.) et ALEXANDER (H.). — J. gen. Microbiol., 1948, 2, 315.
191. KINSLOE (H.), ACKERMAN (E.) et REID (J.J.). — J. Bact., 1954, 68, 373.
192. KLEMPARSKAYA (N.N.). — Z. Mikrobiol. Epidemiol. Immunitätsforsch., 1939, 3, 124. Cité par Salton (321).
193. KOCH (G.) et WEIDEL (W.). — Z. Naturforsch. 1956, 11 b, 345.
194. KOCH (G.) et DREYER (W.J.). — Virology, 1958, 6, 291.
195. KOEPSSELL (H.J.) et JOHNSON (M.J.). — J. Biol. Chem., 1942, 145, 379. Cité par Hugo (162).
197. KRÖGER (E.). — Z. Naturforsch., 1955, 10 b, 704.
198. KRUSE. — Cité par Tomcsik et Baumann-Grace (378).
199. LABAW (W.) et MOSLEY (V.M.). — Biochim. Biophys. Acta, 1954, 15, 325.
200. LAMANNA (C.), CHATIGNY (M.A.) et COLLEDGE (E.H.). — J. Bact., 1959, 77, 104.
201. LANCEFIELD (R.C.). — J. Exptl. Med., 1943, 78, 465.
202. LANDSTEINER (K.). — « The Specificity of Serological Reactions » Revised edition. Harvard University Press, 1948. Cité par Kabat (178).
203. LANDY (M.), TRAPANI (R.J.) et CLARK (W.R.). — Amer. J. Hyg., 1955, 62, 54.
204. LANDY (M.) et PILLEMER (L.). — J. Exptl. Med., 1956, 103, 823.
205. LANDY (M.) et PILLEMER (L.). — J. Exptl. Med., 1956, 104, 383.
206. LANGERON (M.). — Précis de Microscopie. Masson et Cie, Paris, 1949.
207. LAWRENCE (C.A.). — Surface-active quaternary ammonium germicides. Academic Press Inc., New York, 1950.
208. LEDERBERG (J.). — Proc. Nat. Acad. Sci., 1956, 42, 574.
209. LEDERBERG (J.). — J. Bact., 1957, 73, 144.
210. LITWACK (G.) et PRAMER (D.). — Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1956, 91, 290.
211. LOISELEUR (J.). — Ann. Inst. Pasteur, 1945, 71, 378.
212. LUBISOT (P.). — Thèse médecine, Lyon, 1958.
213. LOBOCHINSKY (B.) et ZALTA (J.P.). — Bull. Soc. Chim. Biol., 1954, 36, 1363.

214. LÜDERITZ (O.) et WESTPHAL (O.). — *Z. Naturforsch.*, 1952, 7 b, 548.
215. LÜDERITZ (O.), WESTPHAL (O.), NETER (E.) et EICHENBERGER (E.). — III^e Intern. Congr. Biochem. 1955. Résumé des communications, Section 10, n° 40.
216. LÜDERITZ (O.), STAUB (A.M.), STIRM (S.) et WESTPHAL (O.). — *Biochem. Z.*, 1958, 330, 193.
217. MA (T.S.) et ZUAZAGA (G.). — *Ind. Engng. Chem. (Anal.)*, 1942, 14, 280.
218. MAC CARTY (M.) et LANCEFIELD (R.C.). — *J. Exptl. Med.*, 1955, 102, 11.
219. MAC CARTY (M.). — *J. Exptl. Med.*, 1956, 104, 629.
220. MAC CLUER (R.H.), VAN EYS (J.) et TOUSTER (O.). — *Abstr. of Papers*, 128th Meeting Am. Chem. Soc., 1955, p. 65 c. Cité par Park et Strominger (273).
221. MAC FADYEN (A.), MORRIS (G.H.) et ROWLAND (S.). — *Proc. Roy. Soc. B.*, 1900, 67, 250. Cité par Hugo (162).
222. MAC FADYEN (A.) et ROWLAND (S.). — *Centr. Bakteriöl. Parisitenk., Abt. I, Orig.*, 1901, 30, 753. Cité par Hugo (162).
223. MAC ILWAIN (H.). — *J. gen. Microbiol.*, 1948, 2, 288.
224. MAC KINNEY (R.E.). — *J. Bact.*, 1953, 66, 453.
225. MAC LENNAN (A.P.) et RONDLE (C.J.M.). — *Nature*, 1957, 180, 1045.
226. MAC QUILLEN (K.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, 27, 410.
227. MARKHAM (R.). — *Biochem. J.*, 1942, 36, 790.
228. MASON (D.J.) et POWELSON (D.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, 29, 1.
229. MAURER (P.H.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1953, 83, 879.
230. MEIER (R.). — *Ciba Found Symp. on Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*. J. et A. Churchill. Londres, 1958, p. 157.
231. MEJSEL (M.N.) et UMANSKAYA (V.P.). — *Mikrobiol., U.R.S.S.*, 1949, 18, 11.
232. MELTZER (S.J.). — *N.Y. Med. J.*, 1892, 56, 708. Cité par Hugo (162).
233. MESROBEANU (L.). — *Les antigènes glucido-lipidiques des bactéries*. Masson et Cie, Paris, 1936.
234. MEYER (K.), THOMPSON (R.), PALMER (J.W.) et KHORAZO (D.). — *J. Biol. Chem.*, 1936, 113, 479.
235. MEYER (K.) et HAHNEL (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, 163, 723.
236. MEYER (K.), HAHNEL (E.) et STEINBERG (A.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, 163, 733.
237. MICHON (J.) et BOURILLON (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, 41, 277.
238. MICKLE (H.). — *J. Roy. Microscop. Soc.*, 1948, 68, 10.
239. MILES (A.A.) et PIRIE (N.W.). — *Brit. J. Exp. Pathol.*, 1939, 20, 278.
240. MITCHELL (P.D.) et CROWE (G.R.). — *J. gen. Microbiol.*, 1947, 1, 77.
241. MITCHELL (P.). — *Symp. Soc. gen. Microbiol.*, 1949, 1, 55.
242. MITCHELL (P.) et MOYLE (J.). — *J. gen. Microbiol.*, 1951, 5, 966.

243. MITCHELL (P.) et MOYLE (J.). — Symp. Soc. gen. Microbiol., 1956, 6, 150.
244. MITTWER (T.), BARTHOLOMEW (J.W.) et KALLMAN (B.J.). — Stain. Technol., 1950, 25, 169.
245. MONTREUIL (J.) et SCHEPPLER (M.). — Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 13.
246. MOORE (S.) et STEIN (W.H.). — J. Biol. Chem., 1948, 176, 367.
247. MORGAN (W.T.J.). — Biochem. J., 1937, 31, 2003.
248. MORGAN (W.T.J.) et PARTRIDGE (S.M.). — Biochem. J., 1940, 34, 169.
249. MORGAN (W.T.J.) et PARTRIDGE (S.M.). — Biochem. J., 1941, 35, 1140.
250. MORGAN (W.T.J.) et PARTRIDGE (S.M.). — Brit. J. Exp. Path., 1942, 23, 151.
251. MORGAN (W.T.J.). — Brit. J. Exp. Path., 1943, 24, 41.
252. MORGAN (W.T.J.) et SCHÜTZE (H.). — Lancet, 1943, 11, 284.
253. MORGAN (W.T.J.) et WATKINS (W.M.). — Brit. J. Exp. Path., 1944, 25, 221.
254. MUDD (S.), SHAW (C.H.), CZARNETZKY (E.J.) et FLOSDORF (E.W.). — U.S. Public Health Repts., 1937, 52, 887.
255. MUYS (G.T.). — Leeuwenhoek ned. Tijdschr., 1949, 15, 203.
256. NAIMARK (M.), KLAIR (J.) et MOSHER (W.A.). — J. Franklin Inst., 1951, 251, 279 et 402.
257. NAKAMBURA (O.). — Z. Immünforsch., 1924, 38, 425.
258. NETER (E.). — Bact. Rev., 1956, 20, 166.
259. NETER (E.), WESTPHAL (O.), LÜDERITZ (O.) et GORZINSKI (E.A.). — Ann. N.Y. Acad. Sci., 1956, 66, 141.
260. NETER (E.), GORZINSKI (E.A.), GINO (R.M.), WESTPHAL (O.) et LÜDERITZ (O.). — Canad. J. Microbiol., 1956, 2, 232.
261. NETER (E.), WESTPHAL (O.), LÜDERITZ (O.), GORZINSKY (E.A.) et EICHENBERGER (E.). — J. Immunol., 1956, 76, 377.
262. NEWTON (B.A.). — Bact. Rev., 1956, 20, 14.
263. NEWTON (B.A.). — Symp. Soc. gen. Micr., 1958, 8, 62.
264. NISONOFF (A.) et PRESSMAN (D.). — J. Immunol., 1958, 80, 417.
265. NOSSAL (P.M.). — Australian. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 1953, 31, 583.
266. NOSSAL (P.M.), KEECH (D.B.) et MORTON (D.J.). — Biochim. Biophys. Acta, 1956, 22, 412.
267. NOVELLI (A.). — Experientia, 1953, 9, 34.
268. ORSKOV (F.). — Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1956, 39, 147.
269. PALMER (J.W.) et GERLOUGH (T.D.). — Science, 1940, 92, 155.
270. PARK (J.T.) et JOHNSON (M.J.). — J. Biol. Chem., 1949, 179, 585.
271. PARK (J.T.). — J. Biol. Chem., 1952, 194, 877, 885 et 897.
272. PARK (J.T.). — « Symposium on the mode of action of antibiotics » 2nd Intern. Congr. Biochem. Paris, 1952, p. 31.
273. PARK (J.T.) et STROMINGER (J.L.). — Science, 1957, 125, 99.
274. PARTRIDGE (S.M.). — Biochem. J., 1948, 42, 238.
275. PERLMAN (E.) et GOEBEL (W.F.). — J. Exptl. Med., 1946, 84, 223.

276. PETHICA (B.A.). — Trans. Farad. Soc., 1955, 51, 1402.
277. PETHICA (B.A.). — J. gen. Microbiol., 1958, 18, 473.
278. PIRIE (A.). — Brit. J. Exp. Path., 1940, 21, 125.
279. POCHON (J.). — In J. DUMAS et les Chefs de Service de l'Institut Pasteur - Bactériologie Médicale, Flammarion, Paris, 1951, p. 33.
280. PON (G.). — Thèse Université. Paris, 1953.
281. PON (G.) et STAUB (A.M.). — Bull. Soc. Chim. Biol., 1952, 34, 1132.
282. PON (G.) et STAUB (A.M.). — Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, 1283.
283. POTTER (V.R.) et ELVEHJEM (C.A.). — J. Biol., Chem., 1936, 114, 495.
284. PRESTIDGE (L.S.) et PARDEE (A.B.). — J. Bact., 1957, 74, 48.
285. PREVOT (A.R.). — Exp. Ann. Biol. Cell., 1958, Masson edit. Paris, p. 1.
286. PRUDHOMME (R.O.) et GRABAR (P.). — J. Chim. Phys., 1949, 46, 325.
287. PRUDHOMME (R.O.). — J. Chim. Phys., 1957, 54, 333.
288. PRUDHOMME (R.O.) et GUILMART (Th.). — J. Chim. Phys., 1957, 54, 336.
289. PRUDHOMME (R.O.). — Bull. Soc. Chim. Biol., 1957, 39, 425.
290. PUTNAM (F.W.). — Adv. in Protein Chemistry, 1948, 4, 79.
291. PYNE (C.K.). — Exp. Cell. Res., 1958, 14, 388.
292. RAISTRICK (H.) et TOPLEY (W.C.C.). — J. Exptl. Med., 1934, 15, 113.
293. REDFIELD (R.R.). — Biochim. Biophys. Acta, 1953, 10, 344.
294. REPASKE (R.). — Biochim. Biophys. Acta, 1956, 22, 189.
295. REPASKE (R.). — Biochim. Biophys. Acta, 1958, 30, 225.
296. RHULAND (L.E.). — Nature, 1960, 185, 224.
297. RICHMOND (M.H.). — J. gen. Microbiol., 1957, 16, IV.
298. RIMINGTON (C.). — Erg. Phys., 1933, 35, 712. Cité par Staub (348).
299. RIMINGTON (C.). — Biochem. J., 1940, 34, 931.
300. ROBERTS (R.S.). — J. Comp. Path., 1952, 59, 284.
301. RONDANELLI (E.G.), FERRATA (A.) et GORINI (P.). — Boll. Ist. sieroter. milan., 1957, 36, 433.
302. ROTMAN (B.). — J. Bact., 1956, 72, 827.
303. ROUYER (M.) et GRABAR (P.). — Ann. Inst. Past., 1947, 73, 215.
304. ROUYER (M.), PILLET (J.), ORTA (B.) et NICOL (M.J.). — Ann. Inst. Pasteur, 1957, 92, 276.
305. ROWLEY (D.). — Lancet, 1955, 1, 232.
306. ROWLEY (D.). — Brit. J. exp. Path., 1956, 37, 223.
307. SALTON (M.R.J.). — J. gen. Microbiol., 1951, 5, 391.
308. SALTON (M.R.J.) et HORNE (R.W.). — Biochim. Biophys. Acta, 1951, 7, 19.
309. SALTON (M.R.J.) et HORNE (R.W.). — Biochim. Biophys. Acta, 1951, 7, 177.

- 310. SALTON (M.R.J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, 8, 510.
- 312. SALTON (M.R.J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, 9, 334.
- 313. SALTON (M.R.J.). — *Nature*, 1952, 170, 746.
- 314. SALTON (M.R.J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, 10, 512.
- 315. SALTON (M.R.J.). — *J. gen. Microbiol.*, 1953, 9, 512.
- 316. SALTON (M.R.J.) et WILLIAMS (R.C.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1954, 14, 455.
- 317. SALTON (M.R.J.). — *J. gen. Microbiol.*, 1954, 11, IX.
- 318. SALTON (M.R.J.). — 3^e Congr. Intern. Biochimie Bruxelles, 1955, p. 404.
- 319. SALTON (M.R.J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 22, 495.
- 320. SALTON (M.R.J.). — In « *Bacterial Anatomy* », Sixth symposium of the society for general Microbiology. Cambridge University press, 1956, p. 81.
- 321. SALTON (M.R.J.). — *Bact. Rev.*, 1957, 21, 82.
- 322. SALTON (M.R.J.) et GHUYSEN (J.M.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 24, 160.
- 323. SALTON (M.R.J.). — *Nature*, 1957, 180, 338.
- 324. SALTON (M.R.J.) et GHUYSEN (J.M.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 24, 160.
- 325. SALTON (M.R.J.). — *Proc. 2nd Int. Congr. Surf. Activity Butterworth. London*, 1957, p. 274.
- 326. SALTON (M.R.J.). — *J. gen. Microbiol.*, 1958, 18, 481.
- 327. SALTON (M.R.J.) et SHAFI (F.). — *Nature*, 1958, 181, 1321.
- 328. SALTON (M.R.J.) et GHUYSEN (J.M.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, 36, 552.
- 329. SALTON (M.R.J.) et PAVLIK (J.G.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 39, 398.
- 330. SCHAEGLER (R.W.) et DUBOS (R.J.). — *J. Exptl. Med.*, 1956, 104, 67.
- 331. SCHRAM (G.), WESTPHAL (O.) et LÜDERITZ (O.). — *Z. Naturforsch.*, 1952, 7 b, 594.
- 332. SCHULMAN (J.H.) et RIDEAL (E.K.). — *Proc. Roy. Soc. B.*, 1937, 122, 29.
- 333. SCHULMAN (J.H.), PETHICA (B.A.), FEW (A.V.), SALTON (M.R.J.). — *Progress in Biophysics and Biophysical chemistry*, 1955, 5, 41.
- 334. SCHÜTTE (E.) et KRISCH (K.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1958, 311, 121.
- 335. SCOTT (T.A.) et MELVIN (E.H.). — *Anal. Chem.*, 1953, 28, 1656.
- 336. SEVAG (M.G.), SMOLENS (J.) et STERN (K.G.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, 139, 925.
- 337. SHEAR (M.J.) et coll. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1943, 4, 107.
- 338. SHIMOJO. — *Jap. J. Exptl. Med.*, 1951, 21, 159.
- 339. SMITH (E.L.) et STOCKELL (A.). — *J. Biol. Chem.*, 1954, 207, 501.
- 340. SMITH (E.L.), STOCKELL (A.) et KIMMEL (J.R.). — *J. Biol. Chem.*, 1954, 207, 551.
- 341. SMITH (H.), STRANGE (R.E.) et ZWARTOUW (H.T.). — *Nature*, 1956, 178, 865.
- 342. SNELL (E.E.), RADIN (N.S.) et IKAWA (M.). — *J. Biol. Chem.*, 1956, 217, 803.
- 343. SOMOGYI (M.). — *J. Biol. Chem.*, 1952, 195, 19.

344. SORENSSEN (S.P.L.) et ANDERSEN (A.C.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1908, 56, 250.
345. SPIES (J.R.). — *In* Colowick (S.P.) et Kaplan (N.O.), *Methods in Enzymology*, 1957, 3, 467.
346. STAHELIN (H.). — *Schweiz. Z. Allg. Path. Bakt.*, 1953, 16, 892.
347. STAHELIN (H.). — *Schweiz. Z. Allg. Path. Bakt.*, 1954, 17, 296.
348. STAUB (A.M.). — *In* Loiseleur (J.), *Techniques de Laboratoire*. Masson et Cie, Paris, 1954, tome I, p. 769.
349. STAUB (A.M.) et TINELLI (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, 39, suppl. 1, 65.
350. STAUB (A.M.), TINELLI (R.), WESTPHAL (O.) et LÜDERITZ (O.). — VII^e Congr. Intern. Microbiol. Stockholm, 1958, Résumés p. 115.
351. STAUB (A.M.), TINELLI (R.), LÜDERITZ (O.) et WESTPHAL (O.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, 96, 303.
352. STEVENS (F.A.) et WEST (R.). — *J. Exptl. Med.*, 1922, 35, 823.
353. STRANGE (R.E.) et POWEL (J.F.). — *Biochem. J.*, 1954, 58, 80.
354. STRANGE (R.E.). — *Biochem. J.*, 1956, 64, 23.
355. STRANGE (R.E.) and DARK (F.A.). — *Nature*, 1956, 117, 185.
356. STRANGE (R.E.) et THORNE (C.B.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 24, 160.
357. STRANGE (R.E.). — *Bact. Rev.*, 1959, 23, 1.
358. STRANGE (R.E.) et KENT (L.H.). — *Biochem. J.*, 1959, 71, 333.
359. STROMINGER (J.L.). — « Symposium on uridine nucléotides » *Proc. 3rd Intern. Cong. Biochem. Brussels*, 1955, p. 165.
360. STROMINGER (J.L.). — *J. Biol. Chem.*, 1957, 224, 509.
361. STROMINGER (J.L.). — *In* « Pasteur fermentation Centennial, 1857-1957 » — J.E. McKeen editor, Chas-Pfiser and Co inc. New York. 1958, p. 159.
362. STROMINGER (J.L.). — *Fed. Proc.*, 1959, 18, 334.
363. STROMINGER (J.L.). — *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 1520.
364. SÜDHOF (H.), KELLNER (H.) et SCHULTE (N.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1955, 300, 68.
365. SÜDHOF (H.) et KELLNER (H.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1955, 300, 82.
366. TAL (C.) et GOEBEL (W.F.). — *J. Exptl. Med.*, 1950, 92, 25.
367. TALMAGE (D.W.). — *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1957, 50, suppl. 1, 229.
368. THOMPSON (R.). — *Arch. Path.*, 1940, 30, 1096.
369. THORNLEY (M.J.). — *Ph. D. Thesis University of London*, 1953. Cité par Hugo (162).
370. TILLMANS (J.) et PHILIPPI (K.). — *Biochem. Z.*, 1929, 215, 36.
371. TISSIERES (A.), HOVENKAMP (H.G.) et SLATER (E.C.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 25, 336.
372. TOMCSIK (J.) et GUËX-HOLZER (S.). — *Schweiz. Z. allg. Path. Bakt.*, 1952, 15, 517.
373. TOMCSIK (J.) et GUËX-HOLZER (S.). — *Experientia*, 1954, 10, 484.
374. TOMCSIK (J.) et GUËX-HOLZER (S.). — *J. gen. Microbiol.*, 1954, 10, 97.
375. TOMCSIK (J.) et GUËX-HOLZER (S.). — *J. gen. Microbiol.*, 1954, 10, 317.

376. TOMCSIK (J.) et GRACE (J.B.). — J. gen. Microbiol., 1955, 13, 105.
377. TOMCSIK (J.). — « Bacterial Anatomy » VIth Symp. Soc. gen. Microbiol., Cambridge University Press London, 1956, p. 41.
378. TOMCSIK (J.) et BAUMANN-GRACE (J.B.). — Schweiz. Z. allg. Pathol. Bakteriolog. 1957, 20, 129.
379. UTTER (M.F.) et WERKMAN (C.H.). — Biochem. J., 1942, 36, 485.
380. VENDRELY (R.), PALMADE (C.) et VENDRELY (C.). — Nature, 1956, 178, 1044.
381. VINCENZI (L.). — Hoppe-Seyl., 1887, 11, 181.
382. WAGNER-JAUREGG (Th.). — Angew. Chem., 1940, 53, 319.
383. WAGNER-JAUREGG (Th.). — Angew. Chem., 1942, 55, 21.
384. WALKER (J.). — Biochem. J., 1940, 34, 325.
385. WARREN (H.), GRAY (J.) et BARTELL (P.). — J. Bact., 1955, 70, 614.
386. WARREN (G.H.), GRAY (J.) et YURCHENCO (J.A.). — J. Bact., 1957, 74, 788.
387. WEBB (M.). — J. gen. Microbiol., 1948, 2, 260.
388. WEBSTER (M.E.), LANDY (M.) et FREEMAN (M.E.). — J. Immunol. 1952, 69, 131 et 143.
389. WEIBULL (C.). — J. Bact., 1953, 66, 688.
- 389 bis. WEIBULL (C.). — Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1958, 42, 324.
- 389 ter. WEIBULL (C.). — Proc. third int. Congr. Bioch. Bruxelles, 1955, 411.
390. WEIDEL (W.). — Z. Naturforsch., 1951, 6 b, 251.
391. WEIDEL (W.), KOCH (G.) et LOHSS (F.). — Z. Naturforsch., 1954, 9 b, 398.
- 391 bis. WEIDEL (W.), KOCH (G.) et BOBOSCH (K.). — Z. Naturforsch. 1954, 9 b, 573.
392. WEIDEL (W.) et PRJMSIGH (J.). — Z. Naturforsch., 1957, 12 b, 421.
393. WEIDEL (W.) et PRIMOSIGH (J.). — J. gen. Microbiol., 1958, 18, 513.
394. WELSH (M.). — Ergebn. Mikrobiol. Immunit., 1957, 30, 217.
395. WELSH (M.). — J. gen. Microbiol., 1958, 18, 491.
396. WELSHIMER (H.J.). — J. Bact., 1953, 66, 112.
397. WESTPHAL (O.). — Angew. Chem., 1952, 64, 314.
398. WESTPHAL (O.), LÜDERITZ (O.) et BISTER (F.). — Z. Naturforsch., 1952, 7 b, 148.
399. WESTPHAL (O.), LÜDERITZ (O.), EICHENBERGER (E.) et KEIDERLING (W.). — Z. Naturforsch., 1952, 7 b, 536.
400. WESTPHAL (O.), LÜDERITZ (O.), FROMME (I.) et JOSEPH (N.). — Angew. Chem., 1953, 65, 555.
401. WESTPHAL (O.) et LÜDERITZ (O.). — Intern. Congr. Microbiol. Proc. Sixth., 1953, 2, 22.
402. WESTPHAL (O.). — In Meier (230), discussion.
403. WESTPHAL (O.) et LÜDERITZ (O.). — Angew. Chem., 1954, 66, 407.
404. WESTPHAL (O.), LÜDERITZ (O.), EICHENBERGER (E.) et NETER (E.). — Ciba Symp. on Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides. J. et A. Churchill, Londres, 1958, p. 187.

405. WESTPHAL (O.), NOWOTNY (A.), LÜDERITZ (O.), HURNI (H.), EICHENBERGER (E.) et SCHÖNHOLZER (G.). — *Pharm. Acta Helv.*, 1958, 33, 401.
406. WESTPHAL (O.). — Pyrogens, in *Trans. 2nd Macy conf. on Polysaccharides in Biology*. Macy Foundation New York, 1958, p. 115.
407. WESTPHAL (O.). — *Naturwissenschaften*, 1959, 46, 50.
408. WESTPHAL (O.). — *Ann. Inst. Pasteur*, sous presse.
409. WIGGERT (W.P.), SILVERMAN (M.), UTTER (M.F.) et WERKMAN (C.H.). — *Iowa State Coll. J. Sci.*, 1939, 14, 179. Cité par Hugo (162).
410. WILKINSON (J.F.). — *Bact. Rev.*, 1958, 22, 46.
411. WILLS (E.D.). — *Biochem. J.*, 1954, 57, 109.
412. WILSON (G.S.) et MILES (A.A.). — « *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity* », 4th Edition. Arnold London, 1955, 1, 763.
413. WOOD (R.W.) et LOOMIS (A.L.). — *Phil. Mag.*, 1927, 4, 417.
414. WORK (E.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1949, 3, 400.
415. WORK (E.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1950, 5, 204.
416. WORK (E.). — *Biochem. J.*, 1950, 46, V.
417. WORK (E.). — *Biochem. J.*, 1951, 49, 17.
418. WORK (E.) et DEWEY (D.L.). — *J. gen. Microbiol.*, 1953, 9, 394.
419. WORK (E.). — *Nature*, 1957, 179, 841.
420. YOSHIDA (N.), FUKUYA (I.), KAKUTANI (I.), TANAKA (S.), TAKAISHI (K.), NISHINO (K.) et HASHIMOTO (T.). — *Tokushima J. Exptl. Med.*, 1955, 2, 117.
421. ZILLIKEN (F.). — *Fed. Proc.*, 1959, 18, 966.

TABLE DES MATIERES

PREAMBULE	15
-----------------	----

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

<i>Chapitre I.</i> — Isolement des parois	19
<i>Chapitre II.</i> — Les constituants de la paroi des bactéries à Gram négatif	29
<i>Chapitre III.</i> — Organisation de la paroi	49
<i>Chapitre IV.</i> — La capsule	77

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

<i>Chapitre I.</i> — Techniques analytiques	87
<i>Chapitre II.</i> — Préparation des bactéries	99
<i>Chapitre III.</i> — Obtention et propriétés des parois isolées	103
<i>Chapitre IV.</i> — Séparation des constituants de structure à partir des parois isolées	109
<i>Chapitre V.</i> — Propriétés biologiques des deux fractions isolées	113
<i>Chapitre VI.</i> — Composition et nature chimique du substrat du lysozyme et de l'antigène somatique	117
<i>Chapitre VII.</i> — Discussion, essai de synthèse. Structure de la paroi ectoplasmique d' <i>Eberthella typhi</i>	121
CONCLUSIONS	128
BIBLIOGRAPHIE	131

IMPRIMERIE R. VANÇON — PARIS.
